

**Elektrophysiologie
und Pharmakologie der Lichtantwort
und des zeitlichen Auflösungsvermögens
von monopolaren Zellen im Komplexauge
von *Calliphora erythrocephala***

Hans Straka

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Elektrophysiologie und Pharmakologie der Lichtantwort
und des zeitlichen Auflösungsvermögens von
monopolaren Zellen im Komplexauge von
Calliphora erythrocephala

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Hans Straka
aus Oberammergau

München 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schuller

2. Berichterstatter: Dr. M. Vater

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 4. 1989

Die vorliegende Arbeit wurde am zoologischen Institut der Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. F. Zettler angefertigt.

Für Fritz

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. F. Zettler, der das Ende dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben konnte.

Danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Zettler, vorallem aber Herrn Dr. J. Ammermüller für seine ständigen Anregungen und Diskussionen und Frau I. Rambold für ihre Hilfsbereitschaft, mit der sie viele Arbeiten erleichterte.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	Seite	1
2.	MATERIAL UND METHODEN		9
2.1.	Tiermaterial		9
2.2.	Präparation		9
2.3.	Applikation von pharmakologischen Substanzen		10
2.4.	Elektroden		13
2.4.1.	Einzelelektroden		13
2.4.2.	Doppelelektroden		14
2.5.	Lösungen für die Elektrodenfüllung		17
2.6.	Ableitung und Versuchsaufbau		18
2.7.	Bestimmung der Widerstandsänderung		22
3.	ERGEBNISSE		24
3.1.	Vorbemerkungen zu den intrazellulären Ableitungen		24
3.2.	Bestimmung von charakteristischen Eigen- schaften des On- und Off-Transienten		25
3.2.1.	Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit Rechtecklichtreizen		25
3.2.2.	Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit Sinuslichtreizen		27
3.2.3.	Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit ringförmigen Lichtreizen		31
3.2.4.	Widerstandsverhalten der monopolaren Zellen, während des lichtinduzierten Potentials		34
3.2.5.	Latenzzeiten von On- und Off-Transient		37
3.3.	Intrazelluläre Ableitungen von monopolaren Zellen unter Beeinflussung der synaptischen Transmission		40

3.3.1.	Vorbemerkungen zu den pharmakologischen Versuchen	40
3.3.2.	Beeinflussung der cholinergen Transmission	42
3.3.2.1.	Acetylcholin	42
3.3.2.2.	Decamethonium und Hexamethonium	45
3.3.2.3.	Atropin und Curare	48
3.3.3.	Beeinflussung der histaminergen Transmission	51
3.3.3.1.	Ranitidin, Metiamid, Cimetidin und Promethazin	51
3.3.4.	Beeinflussung der GABAergen Transmission	54
3.3.4.1.	GABA	54
3.3.4.2.	Bicucullin und Pikrotoxin	57
3.4.	Sinusförmige Lichtreizung unter pharmakologischer Beeinflussung des lichtinduzierten Potentials	61
3.4.1.	Blockierung des Off-Transienten	61
3.4.2.	Blockierung des On-Transienten	70
4.	DISKUSSION	80
4.1.	Pharmakologie der monophasischen Zellen und mögliche funktionelle Bedeutung der beteiligten Transmitter	80
4.1.1.	On-Transient: Histamin	80
4.1.2.	Off-Transient	82
4.1.2.1.	Off-Transient: Acetylcholin	84
4.1.2.2.	Off-Transient: GABA	88
4.2.	Charakteristische Merkmale des Off-Transienten	91
4.3.	Zeitliches Auflösungsvermögen der monophasischen Zellen	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG	101
6.	LITERATUR	106

1. EINLEITUNG

Aufgrund histologischer Studien ist der morphologische Aufbau des Komplexauges von Insekten und speziell von Dipteren recht gut bekannt. Mittels Golgi- und anderen Silberfärbungsmethoden konnten die neuronalen Elemente des peripheren visuellen Systems licht- und elektronenmikroskopisch identifiziert und ihre synaptischen Verknüpfungen zum großen Teil bestimmt werden (Trujillo-Cenoz & Melamed 1970; Strausfeld & Braitenberg 1970; Boschek 1971; Strausfeld 1971; Übersichtsartikel Strausfeld 1984).

Die erste synaptische Region des Komplexauges der Fliege (Lamina ganglionaris) bildet mit ihren 15 verschiedenen Elementen ein recht komplexes Netzwerk (Strausfeld 1971; Übersichtsartikel Strausfeld & Nässel 1981; Shaw 1981).

Abb. 1 zeigt ein schematisches Diagramm der neuronalen Verschaltung der Lamina ganglionaris, das auf den erwähnten histologischen Daten basiert.

Die Axone von 6 individuellen Photorezeptoren, R1-6, aus jeweils 6 verschiedenen Ommatidien bilden in der Lamina ganglionaris eine Cartridge (Braitenberg 1967; Kirschfeld 1967). Die zentralen Photorezeptoren jedes Ommatidiums, R7/8, ziehen ohne synaptische Kontakte durch die Lamina hindurch zum 2. optischen Ganglion, der Medulla (Strausfeld 1971; Campos-Ortega & Strausfeld 1972).

Zwischen den in der Lamina ringförmig angeordneten 6 Photorezeptoraxonen jeder Cartridge und den beiden dazu

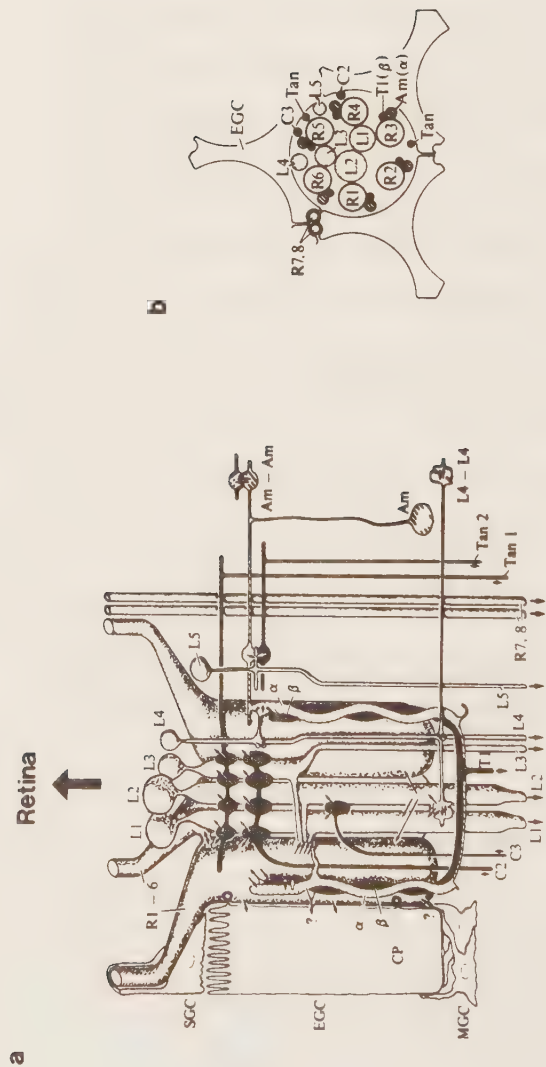


Abb 1: a. Schematische Darstellung eines Neuroommatidiums in der ersten synaptischen Schicht des Komplexauges der Fliege. Die kleinen Pfeile geben die Richtung des Informationsflusses, bzw. die Richtung der synaptischen Verschaltung an. b. Schematischer Querschnitt einer Cartridge; R1-6 : Photorezeptoren R1-6, die den sensorischen Eingang in die Lamina bilden; R7/8 : lange Photorezeptoren, ohne Verschaltung in der Lamina; L1-3 : Monopolare Zellen (second-order Neurone); L4,L5 : Monopolare Zellen (third-order Neurone); C2,C3 : efferente Centrifugalzellen (narrow field); Tan1,Tan2 : efferente Tangentialzellen (wide field); Am,d: Amakrine Zellen mit α -Fortsetzen; T1, β : T1-Zelle mit β -Fortsetzen; CP: Captative projections; SGC: Satellitengliazelle; EGC: Epitheliale Gliazelle; MGC: Marginale Gliazelle; modifiziert aus: Shaw 1981;

postsynaptischen, im Zentrum der Cartridge befindlichen, großen monopolaren Zellen (Monopolaren) L1-L2 (Trujillo-Cenoz & Melamed 1970; Boschek 1971) bestehen etwa 1200 synaptische Verbindungen (Nicol & Meinertzhagen 1982). Des weiteren sind die kleinere Monopolare L3 und die α -Fasern der amakrinen Zellen innerhalb dieser Synapsen-region zu den Photorezeptoren R1-6 postsynaptisch (Strausfeld & Campos-Ortega 1973; Burkhardt & Braitenberg 1976; Nicol & Meinertzhagen 1982; Fröhlich 1985). Die Monopolaren L4, postsynaptisch zu den amakrinen Zellen und präsynaptisch zu den L1-L2 Monopolaren, werden neben den amakrinen Zellen als Kandidaten für die laterale Verschaltung der Lamina angesehen (Strausfeld & Campos-Ortega 1973; Campos-Ortega & Strausfeld 1973; Braitenberg & Debbage 1974; Strausfeld & Campos-Ortega 1977).

Durch 4 efferente Zellen, C2, C3, Tan1 und Tan2, bekommt die Lamina Eingänge von der Medulla, wobei diese Zellen nur mit den Photorezeptoren R1-6 und den Monopolaren L1-L2 synaptische Kontakte bilden (Übersichtsartikel Shaw 1981; Strausfeld & Nässel 1981).

Reproduzierbare identifizierte intrazelluläre Ableitungen konnten bisher nur von den Photorezeptoren und von den Monopolaren L1-L2 gemacht werden (DeVoe 1985). Die Photorezeptoren antworten auf einen rechteckförmigen Lichtreiz mit einer graduierten Depolarisation, die bei hohen Lichtintensitäten aus einer phasischen und einer tonischen Komponente besteht (Burkhardt & Autrum 1960). Die Monopolaren als postsynaptische Elemente antworten dage-

gen auf einen rechteckförmigen Lichtstimulus mit einem dreiphasigen graduierten postsynaptischen Potential (PSP), das aus einem hyperpolarisierenden On-Transienten, einem Plateau und einer depolarisierenden Off-Komponente besteht (Shaw 1968; Autrum et al 1970; Järviletho & Zettler 1971).

Durch Applikation von sinusförmigen Lichtreizen wurde das zeitliche Auflösungsvermögen dieser Zellen untersucht (Zettler 1969; Järviletho & Zettler 1971). Dabei stellte sich heraus, daß das zeitliche Auflösungsvermögen der postsynaptischen monopolaren Zellen höher ist als das der Photorezeptoren (Järviletho & Zettler 1971). Ebenso zeigte sich, daß die hohe Verschmelzungsfrequenz des ERGs von bis zu 300 Hz bei Reizung mit einem Flickerlicht (Autrum 1950) durch die monopolare Komponente am ERG hervorgerufen wird (Järviletho & Zettler 1971).

Entgegen der großen Anzahl von morphologischen und elektrophysiologischen Studien wurde über die Pharmakologie der Laminaneurone und speziell der Photorezeptoren und der Monopolaren erst in den letzten beiden Jahren Grundlegendes bekannt.

Der komplexere Potentialverlauf der Monopolaren gegenüber dem der Photorezeptoren sowie die Tatsache, daß die Monopolaren nicht nur von den Photorezeptoren, sondern auch von anderen Zellen synaptische Eingänge bekommen, macht es allerdings wahrscheinlich, daß die Verschaltung des lichtinduzierten monopolaren Potentials über mehrere Zellen läuft und damit auch weitere Transmitter an der

Übertragung beteiligt sind.

Über mögliche Transmitter der Photorezeptoren gibt es in der Literatur mehrere Hinweise. Autrum und Hoffmann (1957) wiesen nach, daß die Amplituden des ERGs von Fliegen nach Applikation von Pikrotoxin stark verkleinert werden. Im Ocellus von Libellen wurde nach Badapplikation von Pikrotoxin der Off-Transient der Antwort der ONDs reduziert (Klingman & Chappell 1978; Stone & Chappell 1981). Ableitungen der L1-L2 Neuronen im Komplexauge von *Calliphora*, bei gleichzeitiger Blockierung der GABAergen Transmission führten zu der Vermutung, daß GABA der Transmitter der Photorezeptoren ist (Zimmermann 1978). Immunocytochemische Untersuchungen des Komplexauges von Dipteren zeigten, daß nur die langen R7 Photorezeptoren und die zu den monopolaren Zellen präsynaptischen C2-Fasern GABAerg sind (Datum et al 1986; Meyer et al 1986). Klingman und Chappell (1978) konnten am Ocellussystem von Libellen das PSP der ocellären Nervendendriten (OND) durch den Acetylcholinblocker Curare vollständig blockieren. Die ocellären Photorezeptoren und ONDs zeigen im normalen Zustand ähnliche lichtinduzierte Potentiale wie die R1-6 Photorezeptoren und die L1-L2 Monopolaren des Komplexauges von Dipteren. Auch die Lichtantwort der L-Neurone im Heuschreckenocellus konnte durch Badapplikation von Curare unterdrückt werden (Ammermüller & Weiler 1985). Die Badapplikation von verschiedenen Acetylcholinantagonisten reduzierten das Monopolarenpotential der L1-L2 Neurone im Komplexauge von *Calliphora* (Datum 1987).

Neuere Untersuchungen machten allerdings plausibel, daß nicht Acetylcholin, sondern Histamin ein Neurotransmitter der Photorezeptoren von Komplexauge und Ocellus ist. Hardie (1987,1988) zeigte, daß iontophoretisch appliziertes Histamin eine Hyperpolarisation, ähnlich dem lichtinduzierten On-Transienten des PSPs, der Monopolaren von Dipteren hervorruft. Spezifische Histaminantagonisten (Ranitidin, Metiamid) waren in der Lage, sowohl das histamininduzierte, als auch das lichtinduzierte Potential vollständig zu blockieren (Hardie 1987,1988; Straka & Zettler 1988). Ähnliche Ergebnisse wurden bei den L-Neuronen im Heuschreckenocellus erhalten (Simmons & Hardie 1988). Immuncytochemische Arbeiten wiesen Histamin in den ocellären Photorezeptoren von Heuschrecken und Fliegen, sowie in den Photorezeptoren R1-6 und R8 des Komplexauges von Dipteren und in den Photorezeptoren von Schaben nach (Nässel et al 1988; Pirvola et al 1988; Schlemmermeyer et al 1989).

Die neuen immuncytochemischen und elektrophysiologischen Befunde sprechen gegen eine Funktion von Acetylcholin als Photorezeptortransmitter, allerdings ist eine Beteiligung von Acetylcholin bei der Verschaltung in der Lamina dennoch sehr wahrscheinlich. In immuncytochemischen Untersuchungen konnten, als einzige Zellen der Lamina, amakrine Zellen als acetylcholinerg identifiziert werden (Datum et al 1989). Des weiteren zeigen Drosophilamutanten, die keine Cholin Acetyltransferaseaktivität in der Lamina mehr besitzen, abnormale ERG Ableitungen. Dabei

wies vor allem der Off-Transient des ERGs, der durch die Off-Komponente der Monopolaren erzeugt wird, Veränderungen auf (Greenspan 1980; Coombe 1986).

Auch eine serotonerge Zelle konnte auf immunocytochemischem Wege in der Lamina von *Calliphora erythrocephala* nachgewiesen werden (Nässel et al 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Transmitterantagonisten das lichtinduzierte Potential der Monopolaren zu beeinflussen vermögen.

Die Applikation der pharmakologischen Substanzen sollte iontophoretisch und nicht über eine Badlösung erfolgen, um eine ubiquitäre Wirkung der Pharmaka auf alle sensitiven Zellen im Gewebe möglichst zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden Doppelelektroden mit einem bestimmten Spitzenabstand entwickelt, deren Herstellung allerdings nicht durch Kleben, sondern durch Ziehen, erfolgte.

Neben einer pharmakologischen Charakterisierung des Verschaltungsweges des Monopolarpotential war vor allem ein Ziel, einzelne Komponenten des lichtinduzierten Potentials selektiv zu blockieren. Mit Hilfe der selektiven Blockierung von einzelnen Potentialkomponenten sollte anschließend das zeitliche Auflösungsvermögen der Monopolaren untersucht werden und wenn möglich die Herkunft des hohen zeitlichen Auflösungsvermögens dieser Zellen aufgeklärt werden.

Bei diesen Untersuchungen sollte das Hauptaugenmerk auf den depolarisierenden Off-Transienten gelegt werden, da über diesen Potentialanteil des lichtinduzierten PSPs der

Monopolaren von *Calliphora* nur sehr wenig bekannt ist. Ähnlich wie in früheren Arbeiten für den On-Transienten (Shaw 1968; Järvilletho & Zettler 1971; Zettler & Weiler 1976), wurden auch hier für den Off-Transienten die charakteristischen Merkmale wie Widerstandsverhalten, Latenzzeit und Antwortverhalten bei Stimulation mit Ringreizen untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten Wildtypfliegen der Art *Calliphora erythrocephala* aus der Zucht des Zoologischen Instituts der Universität München. Die Fliegen hatten zum Zeitpunkt der Versuche ein Alter zwischen 15 und 25 Tagen. Es wurden sowohl Weibchen als auch Männchen verwendet, wobei die weiblichen Präparate bei den elektrophysiologischen Ableitungen eine größere Lebensdauer hatten und eine größere Widerstandsfähigkeit zeigten.

2.2. Präparation

Für die Präparation wurde der Kopf und anschließend der Rüssel in Höhe der Kiefertaster abgeschnitten. Auf einen als indifferente Elektrode dienenden chlorierten Silberdraht wurde dann der Kopf aufgesetzt, mit Wachs befestigt und rundherum abgedichtet, um Flüssigkeitsverlust zu vermeiden. Mit einem zugespitzten Wolframdraht wurde aus der Hinterhauptswand des linken Auges am Cornearand ein rechteckiges Stück Chitin (ca. 0,5mm * 0,5mm) herausgebrochen. Um ein Verstopfen und Abbrechen der Elektroden möglichst zu verhindern, wurden die über der Lamina liegenden Luftsackmembranen und einige der größeren Tracheen entfernt. Anschließend wurde das Loch wieder mit einer dünnen Schicht Vaseline verschlossen und die beiden

Fühler entfernt, um Muskelbewegungen im Kopf zu vermeiden.

Bei den Versuchen mit Doppelelektroden wurde für die zweite Elektrode eine weitere indifferente Elektrode zur Stromrückführung benötigt. Diese bestand aus einem 100 µm dicken Silberdraht, der durch die rechte Hinterhauptswand ins Gewebe eingeführt wurde. Sämtliche Versuche fanden bei Zimmertemperatur von etwa 24-29° C statt.

2.3. Applikation von pharmakologischen Substanzen

Um Pharmaka zu applizieren, die die synaptische Übertragung beeinflussen, standen zwei Möglichkeiten zur Auswahl. Erstens die Badapplikation, wobei die Substanzen über die Badlösung appliziert werden, und zweitens die Applikation über Iontophorese oder Druck, bei der die Substanzen über eine Elektrode nahe am Wirkort injiziert werden.

Die Methode der Badapplikation hat den Vorteil, daß die Konzentration der Substanzen bei der Applikation genauer zu bestimmen ist. Der Nachteil besteht darin, daß die applizierten Substanzen auf alle sensitiven Zellen im Präparat wirken und deshalb mögliche Effekte nicht genau zu lokalisieren sind. Des weiteren können Substanzen, die auf Transmitterrezeptoren agonistisch wirken, nur bedingt mit dieser Methode appliziert werden, da die Konzentration an der Zellmembran nur langsam erreicht wird (Satelle 1980). Aus diesem Grund kann auch eine

Desensibilisierung der Transmitterrezeptoren auftreten, die mögliche Effekte nicht sichtbar werden läßt. Eine weitere Schwierigkeit, technischer Art, besteht in der intrazellulären Ableitung von Zellen in einer Badlösung. Beim Wechsel der Badlösung, die stets eine mechanische Störung der Ableitung darstellt, wird in deren Folge oft die Zelle verloren (Datum 1987).

Aus diesen Gründen wurde die Applikation von pharmakologischen Substanzen über Iontophorese bzw. Druck vorgenommen.

Diese Methode hat zum einen den Vorteil, daß die Pharmaka lokal sehr begrenzt zur Wirkung gebracht werden können, und zum anderen, daß sie am Wirkort (Rezeptoren) sehr schnell in genügend hoher Konzentration vorhanden sind. Dadurch können auch Substanzen, die als Transmitteragonisten bekannt sind, getestet werden.

Da die intrazellulären Ableitungen der Monopolaren stets in der ersten synaptischen Schicht, der Lamina ganglionaris, durchgeführt wurden, war es notwendig, die Applikationselektrode während der Ableitungen ebenfalls dort zu positionieren.

Aufgrund der anatomischen Anordnung der Zellen in der Lamina bekommen die Monopolaren alle Eingänge innerhalb von Cartridges, die gegeneinander in hohem Maße abgedichtet sind (Saint-Marie & Carlson 1983a,b; Shaw 1977; Shaw 1984).

Dadurch ergab sich die Notwendigkeit, daß die Applikationselektrode in derselben Cartridge wie die Ableit-

elektrode oder maximal in einer der Nachbarcartridges lokalisiert sein mußte, wenn eine schnelle Wirkung der applizierten Substanzen gewährleistet sein sollte. Aufgrund des Durchmessers der Cartridges von etwa 10 μm (Boschek 1971; Strausfeld 1971; Braitenberg & Hauser-Holschuh 1972) durfte der Abstand zwischen den Elektroden maximal 15 μm betragen. Bei Elektrodenabständen $< 5 \mu\text{m}$ waren keine stabilen Ableitungen mehr zu erhalten, da der zu geringe Abstand eine Penetration der Monopolaren kaum mehr möglich machte.

Ein allgemeines Problem bei der iontophoretischen Applikation von Pharmaka ist die Größe der Spitzenöffnung der Elektrode. Der spontane Ausstrom von Ionen steigt exponentiell mit abnehmendem Elektrodenwiderstand, wie es für Acetylcholin gezeigt wurde (Krnjevic 1963). Da der Elektrodenwiderstand mit zunehmender Spitzenöffnung abnimmt (Krnjevic 1963), ist damit der spontane Ausstrom von Ionen vom Durchmesser der Elektrodenöffnung abhängig.

Um diesen spontanen Ausstrom zu vermeiden, wird im allgemeinen ein Rückhaltestrom angelegt, der dem Iontophoresestrom entgegengerichtet ist. Verschiedene Untersuchungen (Obata et al 1970; Kelly 1975) zeigten jedoch, daß trotz Anlegen eines Rückhaltestroms immer noch ein spontaner Ausstrom von Ionen stattfindet. Des weiteren findet durch den Rückhaltestrom eine verstärkte Konzentrationsverdünnung der wirksamen Substanz in der Spitze statt, was bei anschließendem Anlegen des Iontophoresestroms eine verzögerte Wirkung nach sich zieht, die zum

Teil mehrere Sekunden betragen kann (Kelly 1975). Bei sehr hohen Rückhalteströmen ist zudem eine weitere Elektrode zur Rückführung des Stromes notwendig, um Stromartefakte zu vermeiden.

Um diese Probleme möglichst zu umgehen, wurden Elektroden mit einem sehr kleinen Spitzendurchmesser (ca. $0,1\ \mu\text{m}$) für die Iontophorese der pharmakologischen Substanzen verwendet. Da bei dieser Größe der Öffnung nur ein sehr geringer Spontanausstrom stattfindet (Kelly 1975), konnte auf die Verwendung von Rückhalteströmen verzichtet werden.

Der Nachteil der höheren Widerstände der Elektroden und damit leichteren Blockierung bei Anlegen des Iontophoresestromes wurde durch Verwendung einer geregelten Hochspannungsstrompumpe im Iontophoreseverstärker ausgeglichen.

2.4. Elektroden

2.4.1. Einzelelektroden

Die Elektroden für die intrazellulären Ableitungen wurden auf einem Horizontalziehgerät gezogen. Die Glaskapillaren bestanden aus Borosilikatglas (Clark GC 150 F) mit $1,5\ \text{mm}$ Außendurchmesser und eingeschweißtem Glasfaden.

Als Füllung wurde 2 M Kaliumacetatlösung verwendet. Der Widerstand dieser Elektroden betrug im Ringer $110\text{--}140\ \text{M}\Omega$. Lediglich in Versuchen, bei denen die Zellen mittels

eines negativen Stroms hyperpolarisiert wurden, diente 2 M Kaliumchloridlösung als Elektrodenfüllung. Der Grund hierfür war der geringere Widerstand dieser Elektroden (80-100 MΩ).

2.4.2. Doppelelektroden

Für die pharmakologischen Versuche war die Entwicklung von speziellen Doppelelektroden notwendig. Da die Ableitungen nicht unter Sichtkontrolle stattfanden, sich die Spitze der Iontophoreseelektrode aber dennoch sehr nahe (5-15 μm) an der abgeleiteten Zelle befinden mußte, war es notwendig, die Ableitelektrode und die Iontophoreselektrode miteinander zu koppeln.

Die Möglichkeit, zwei Einzelelektroden nach dem Ziehen zusammenzukleben, erwies sich zum einen als zu umständlich und zeitraubend, zum anderen war der Ausschuß zu hoch (> 90 %), da beim Kleben oft die sehr feinen Spitzen der Elektroden (ca. 0,1 μm) abbrachen. Aus diesen Gründen wurde eine Methode entwickelt, um Doppelelektroden mit dem benötigten Spitzenabstand von etwa 5-15 μm zu ziehen.

Dazu wurden zwei Glaskapillaren (Borosilikatglas, Clark GC 150 F) von jeweils 7,5 cm Länge, um 2,5 cm versetzt, mit Wachs zusammengeklebt.

Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Wachsnaht nicht zu lang war. Anschließend wurden die zusammengeklebten Glasröhrchen hochkant in ein Horizontalzieh-

gerät eingespannt, das mit einer sehr engen u-förmigen Platinheizschlaufe ausgerüstet war, um eine optimale Aufheizung der Glasröhrchen zu gewährleisten.

Zum Ziehen der Elektroden wurden die Röhrchen zuerst 15 sec lang vorgeheizt und 2 min später gezogen. Das Vorheizen diente dazu, die beiden Glasröhrchen an der späteren Abrißstelle beim Ziehen etwas zusammenzuschmelzen.

Die Schwierigkeit bestand darin, die richtige Stromstärke für das Vorheizen zu finden. War der Strom zu niedrig, dann wurden die beiden Röhrchen einzeln gezogen; war er zu hoch, dann verschmolzen die beiden Elektroden.

Bei geeigneter Vorheizstromstärke trennten sich die beiden Elektrodenschenkel beim Ziehen nur auf den letzten 100 μm und liefen parallel weiter. Die für die Versuche idealen Spitzenabstände lagen bei 5-20 μm (Abb. 2). Dabei war es günstiger, wenn eine der beiden Elektroden etwas länger war. (Abb. 2b). Allerdings spielte es keine Rolle, ob die Ableit- oder die Iontophoreseelektrode länger war. Jede Doppelelektrode wurde vor Versuchsbeginn unter dem Mikroskop auf ihre Verwendbarkeit überprüft. Als Ableit-elektrode diente stets die Elektrode mit dem 2,5 cm überstehenden Schaft, mit dem die Doppelelektrode im Elektrodenhalter befestigt wurde.

Bei der Druckapplikation von Pharmaka mußte die Spitze der Applikationselektrode etwas abgebrochen werden, damit überhaupt ein wirksamer Ausstrom der Substanzen stattfinden konnte. Dazu wurde eine Glasscherbe mit einer glatten

Fläche unter dem Mikroskop mittels eines Mikromanipulators gegen die Doppelelektrode gefahren, wobei darauf geachtet werden mußte, daß die Ableitelektrode nicht berührt wurde. Durch leichtes Klopfen auf die Grundplatte des Mikroskops brach meist die Spitze der Injektions- elektrode etwas ab. Auf diese Weise wurden Elektroden mit einem Spitzendurchmesser von 0,5- 1 μm erhalten, die für die Druckinjektion geeignet waren.

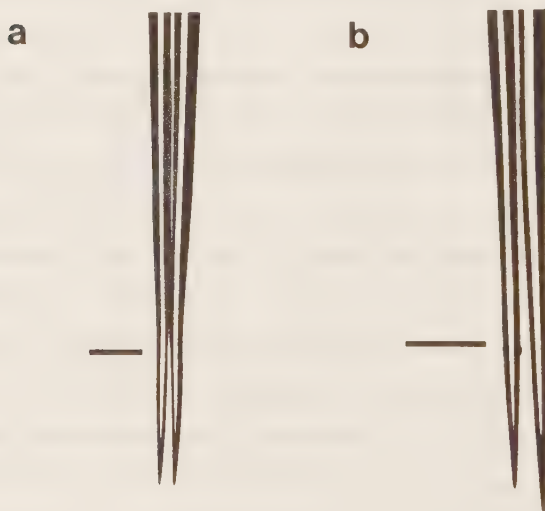


Abb 2: Nach einem speziellen Ziehprogramm hergestellte Doppel- Mikroelektroden. a; Beide Elektroden gleich lang; Spitzenabstand: 8 μm . b; Doppelelektrode, bei der eine Spitze länger ist, als die andere; Spitzenabstand: 8 μm ; Längendifferenz: 8 μm . Kalibrierung: 25 μm .

Die Elektroden wurden maximal zwei Tage aufbewahrt und erst vor dem Versuch mittels einer Spritze von hinten mit den jeweiligen Substanzen gefüllt.

2.5. Lösungen für die Elektrodenfüllung

d-Turbocurarinchlorid	10 mM	Atropinsulfat	200 mM
Decamethoniumbromid	10 mM	Metiamid	100 mM
Hexamethoniumchlorid	100 mM	Cimetidin	100 mM
Bicucullinmethiodid	50 mM	Pikrotoxin	5 mM
Promethazinhydrochlorid	100 mM	GABA	2 M
Ranitidinhydrochlorid	30 mM	Acetylcholin-	
Furosemid	25 mM	chlorid	2 M
4-Acetamido-4'-isothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic Acid (SITS)	100 mM		
4,4'-Diisothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic Acid (DIDS)	100 mM		

Die pharmakologischen Substanzen wurden, bis auf folgende Ausnahmen, von sigma chemicals co. bezogen: Cimetidin (Aldrich), Metiamid (Smith, Kline and French), Ranitidinhydrochlorid (cascan GmbH).

Mit Ausnahme von Pikrotoxin, GABA und Acetylcholin (Lösung in dest. H₂O) wurden alle Pharmaka in 1M Natriumacetat gelöst und lagen bei pH 4-6 als Kationen vor. Die Lösung der Substanzen in 1M Natriumacetat diente zur Erniedrigung der Elektrodenwiderstände. Sämtliche Elektrodenfüllungen ergaben, in Ringer gemessen, Widerstände zwischen 160-220 MΩ.

Durch Anlegen eines positiven Iontophoresestroms konnten die Substanzen appliziert werden. Durch das Lösen in 1M NaAc wurden bei der Iontophorese auch Na⁺-Ionen mit

injiziert, die höchstwahrscheinlich sogar den größten Teil des Iontophoresestroms trugen. Um bei den Wirkungen der Pharmaka auf das lichtinduzierte Potential der abgeleiteten Zellen mögliche, durch die Na^+ -Ionen hervorgerufene, Effekte ausschließen zu können, wurden jeweils Kontrollversuche durchgeführt, bei denen nur Na^+ -Ionen ins Gewebe injiziert wurden. Bei keinem der Kontrollversuche konnte eine Wirkung der Na^+ -Ionen auf lichtinduzierte Potentiale festgestellt werden.

Pikrotoxin konnte aufgrund der geringen Löslichkeit und der Neutralität des Moleküls nur durch Druckapplikation injiziert werden.

2.6. Ableitung und Versuchsaufbau

Für die Ableitungen wurden die Elektroden durch das Loch in der Hinterhauptswand in der Äquatorialebene des Auges ins Gewebe vorgefahren und so positioniert (Winkel von 60° zur Hinterhauptswand, ca. 0,1 mm vom Cornearand entfernt), daß sie stets in die Lamina ganglionaris trafen. Der Vortrieb erfolgte mittels eines Elektromotors mit regelbarer Geschwindigkeit und betrug etwa $1 \mu\text{m}/\text{sec}$. Abb. 3 zeigt einen schematischen Versuchsaufbau.

Zur Ableitung der intrazellulären Potentialänderungen diente ein konventioneller Elektrodenverstärker mit einem FET-Eingang (Electrode Amplifier von Meyer und Renz). Als indifferente Elektrode wurde ein chlorierter Silberdraht benutzt. Bei der Ableitung mit Doppelelektroden war die

Iontophoreseelektrode ebenfalls mit einem Verstärker mit FET-Eingang verbunden, der zusätzlich noch eine geregelte Strompumpe besaß.

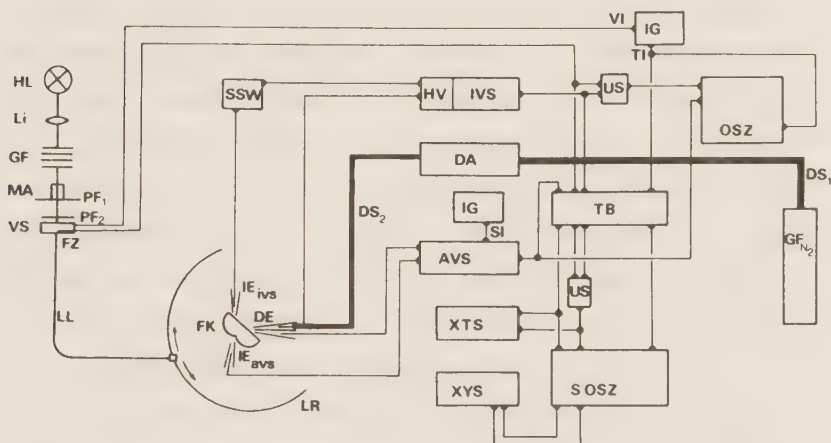


Abb 3: Schematischer Versuchsaufbau

HL	= Halogenlampe	IVS	= Verstärker für die Iontophorese
Li	= Linse	HV	= Hochspannungsteil des Iontophoreseverstärkers
GF	= Graufiltersatz	SSW	= Strom-Spannungswandler
MA	= Motorantrieb für Polarisationsfolie	DA	= Druckapplikator
PF ₁	= Drehbare Polarisationsfolie	DS ₁	= Druckschlauch von N ₂ -flasche zum Druckapplikator
PF ₂	= Feststehende Polarisationsfolie	DS ₂	= Druckschlauch vom Druckapplikator zur Elektrode
VS	= Verschuß (Shutter)	GF _{N₂}	= N ₂ -Gasflasche
FZ	= Fotozelle	IG	= Impuls­generator
LL	= Lichtleiter	VI	= Verschluss­steuerungs­impuls
LR	= Radius des Lichtleiters	TI	= Triggerimpuls
FK	= Fliegenkopf	SI	= Stromtriggerimpuls
DE	= Doppel­elektrode	OSZ	= Oszillograph
IE _{av_s}	= Indifferente Elektrode des Ableitverstärkers	SOSZ	= Speicheroszillograph
IE _{iv_s}	= Indifferente Elektrode des Iontophoreseverstärkers	XTS	= XT-Schreiber
AVS	= Ableitverstärker	XYS	= XY-Schreiber
TB	= Tonband		
US	= Umschaltkästchen		

Dies war notwendig, um auch noch bei sehr hohen Elektrodenwiderständen Substanzen mittels Strompulsen applizieren zu können. Dabei konnte der Verstärker bis 150 V angesteuert werden. Die indifferenten Elektrode des Iontophoreseverstärkers war über einen Strom-Spannungswandler zur genauen Strommessung und Regelung mit dem Verstärker verbunden. Als indifferente Elektrode diente ein dünner Silberdraht, der ins rechte Auge des Fliegenkopfes gesteckt wurde.

Zur Applikation von Pikrotoxin wurde ein Druckapplikator (PDES-02T npi) verwendet, der mit einer N₂-Gasflasche verbunden war und mit 10 bar angesteuert wurde.

Vom Druckapplikator ging ein Reduktionsschlauch zur Elektrode, der dort in das Röhrchen eingeführt und mit einer Wachsmischung aus Kollophonium und Bienenwachs dicht und druckfest (bis zu 4 bar) verklebt wurde.

Die beiden Verstärkerausgänge waren mit einem Oszillographen (HAMEG HM 204) verbunden. Die gemessenen Spannungen wurden gleichzeitig auf einem Tonband (TEAC R71) aufgezeichnet. Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgte per Hand, unter Zuhilfenahme eines digitalen Speicheroszillographen (Gould Type 1421), eines XT-Schreibers (Gould Recorder 220) und eines XY-Schreibers (Goerz Metrawatt SE 790).

Als Lichtquelle für die Reizung des Fliegenauges diente eine Philips Halogenlampe 12V/100W. Der Strahlengang der Lampe wurde durch eine Linse auf die Verschlußöffnung des Shutters fokussiert. Über einen Lichtleiter von 3 mm

Durchmesser, dessen Ende, 7 cm vom Kopf entfernt, waagrecht und senkrecht dreh- und schwenkbar war, wurde der Lichtreiz dem Auge dargeboten. Der Lichtpunkt erschien dem Auge unter einem Winkel von 2° . Bei den Versuchen mit Ringreizen wurde ein Lichtleiter mit 10 mm Durchmesser benutzt, dessen Ende nur 5 cm vom Kopf entfernt war. Durch Aufsetzen von Punkt- oder Ringblenden auf das Ende des Lichtleiters konnte das Auge mit Punkt- (2°) und Ringreizen (innerer Durchmesser 9° , äußerer Durchmesser 11°) gereizt werden.

Die maximale Intensität, die mit dieser Lampe erreicht werden konnte, betrug $2,7 \text{ mW/cm}^2$. Durch einen Satz Graufilter ließ sich die Intensität abschwächen.

Bei den Versuchen, in denen die Fliegenaugen mit einem Rechteckslichtimpuls gereizt wurden, betrug die Belichtungsdauer 150 ms und hatte eine Frequenz von 0,28 Hz.

Zur Erzeugung von sinusförmigen Lichtimpulsen wurden zwei lineare Polarisationsfolien in den Strahlengang vor dem Verschuß (Shutter) gebracht (Abb. 3). Dabei war eine Folie fest und die andere durch einen regelbaren Motorantrieb drehbar gelagert. Durch Steuerung der Motordrehzahl konnten Frequenzen von bis zu 200 Hz erreicht werden. Die Modulation der Helligkeit betrug dabei etwa 40 %.

2.7. Bestimmung der Widerstandsänderung

Die Widerstandsänderung der Monopolaren während des postsynaptischen Potentials wurde durch die Messung des Spannungsabfalls aufgrund eines kurzen Strompulses bestimmt.

Dazu wurden 10 ms lange Strompulse von $\pm 0,5$ nA verwendet. Mittels des Triggerdelays des Impulsgenerators für den Strompuls konnte das Testsignal über die lichtinduzierte Antwort vom On-Transienten bis über den Off-Transienten verschoben werden. Diese Methode hatte den Vorteil, daß die Messung an jeder beliebigen Stelle des Potentials vorgenommen werden konnte.

Für das Testsignal durfte nur ein sehr kurzer und kleiner Strompuls verwendet werden, um eine Vorpolarisation der postsynaptischen Membran möglichst zu verhindern. Zur Kontrolle wurden deshalb positive und negative Strompulse verwendet und zur Berechnung des Membranwiderstandes der Mittelwert gebildet.

Da der Elektrodenwiderstand im Vergleich zum Membranwiderstand der Monopolaren zu hoch ist, um eine Widerstandsänderung zu erkennen, wurde die Summe der beiden Widerstände durch die Bridge Balance des Ableitverstärkers in der Zelle vor der lichtinduzierten Antwort wegkompensiert.

Eine Widerstandsänderung der Monopolaren während des postsynaptischen Potentials äußerte sich nun darin, daß der Gesamtwiderstand nicht mehr kompensiert war.

Bei einem Widerstandsabfall verschiebt sich bei positiven Strompulsen die Bridge Balance zu negativeren Spannungswerten, bei negativen Strompulsen zu positiveren. Bei einem Widerstandsanstieg verhält sich die Bridge Balance entsprechend umgekehrt. Die Widerstandsänderung ist bei vorgegebenem Strom der Spannungsänderung proportional.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorbemerkungen zu den intrazellulären Ableitungen

Die intrazellulären Ableitungen von PSPs der Monopolaren erfolgten stets in der Lamina ganglionaris, wo sich sämtliche synaptischen Eingänge dieser Zellen befinden.

Die Kriterien dafür, daß die Ableitungen in der Lamina stattfanden, waren: erstens das extrazelluläre depolarisierende Potential, zweitens die Ableitung von lamina-typischen Photorezeptorpotentialen zwischen den Ableitungen von monopolaren Zellen (Zettler & Järviletho 1973).

Das Kriterium zur Identifizierung der Monopolaren war ihre typische Potentialform, die bei Stimulation mit einem rechteckförmigen unbunten Lichtreiz aus einem dreiphasigen graduierten Potential besteht (Järviletho & Zettler 1971; Laughlin 1981). Ein weiteres Kennzeichen der Monopolaren ist die enge Winkelabhängigkeit der Lichtantwort sowie ein starkes "Rauschen" des Ruhemembranpotentials bei Dunkeladaptation (Järviletho & Zettler 1971; Zettler & Järviletho 1972).

Die Versuche wurden in der Regel nur an solchen Zellen durchgeführt, deren On-Transient mindestens 20 mV betrug. Bei sehr kleinen Antworten, die durch Verletzung der Membran hervorgerufen werden, können möglicherweise Artefakte auftreten.

3.2. Bestimmung von charakteristischen Eigenschaften des On- und Off-Transienten

3.2.1. Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit Rechtecklichtreizen

Aus Ableitungen von Monopolaren bei gleichzeitiger Reizung des Auges mit Rechtecklichtreizen verschiedener Intensität läßt sich die Kennlinie des postsynaptischen Potentials erstellen.

Auf Licht-An reagieren die Zellen mit einem hyperpolarisierendem On-Transienten, der anschließend in ein Plateau übergeht. Bei Licht-Aus wird ein depolarisierender Off-Transient ausgelöst (Abb. 4 Inset). Bei den bisherigen Arbeiten wurde jedoch fast stets nur der On-Transient untersucht (Järviletho & Zettler 1971; Zettler & Järviletho 1971; Laughlin 1974a) und der Off-Transient hingegen meist außer acht gelassen. Abb.4 zeigt die Kennlinie (U-Int Kennlinie) sowohl des On-, als auch des Off-Transienten, bei der die Amplitudenhöhe der Transienten gegen den Logarithmus der relativen Lichtintensität aufgetragen wurde. Die Höhe der Amplituden des On- und Off-Transienten wurde jeweils vom Ruhemembranpotential aus gemessen.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, daß der Off-Transient ebenso wie der On-Transient von der Lichtintensität abhängig ist und mit steigenden Intensitäten größer wird, wobei die Amplituden des Off-Transienten nur etwa halb so

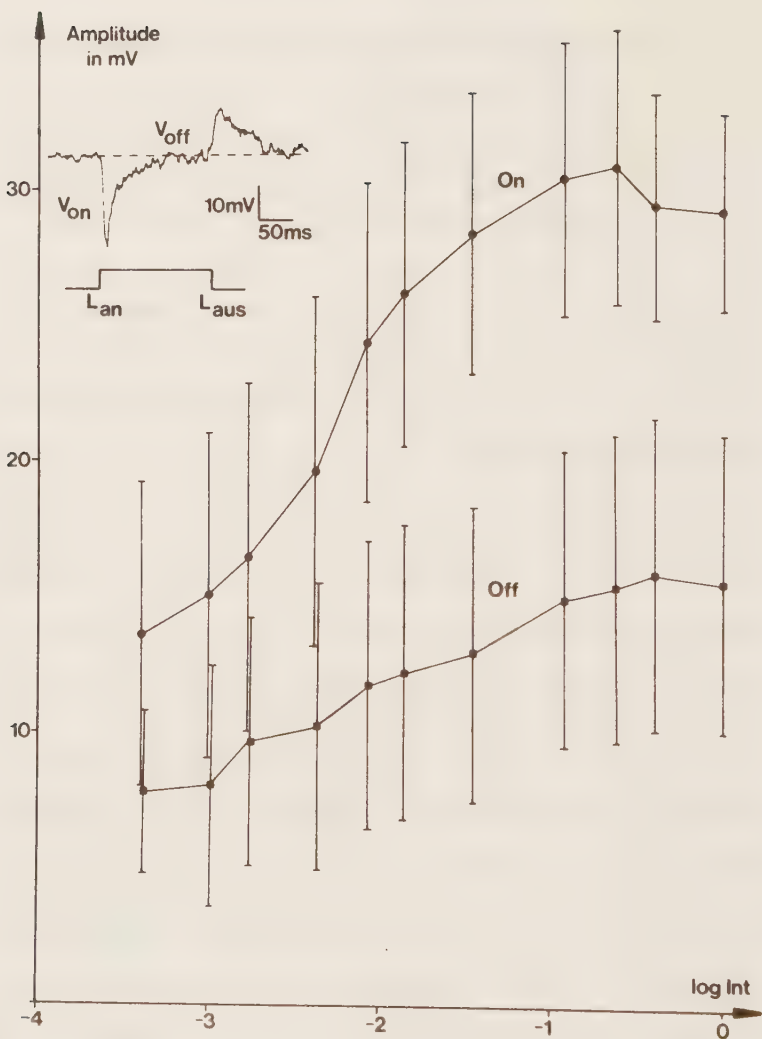


Abb 4: Abhängigkeit der Amplitude ($\pm$ S.D., $n=9$) des On- und Off-Transienten vom Logarithmus der rel. Lichtintensität (U-Int Kennlinie). Die relativ hohen Standardabweichungen der einzelnen Meßwerte sind durch die unterschiedlich guten Ableitungen der einzelnen Zellen bedingt; Variabilität beim On- und Off-Transienten ist etwa gleich; Inset: obere Spur: postsynaptisches Potential (PSP) einer Monopolaren; V_{on} , V_{off} : Amplitude des On- bzw. Off-Transienten; die gestrichelte Linie gibt das Ruhemembranpotential an, von dem aus V_{on} und V_{off} gemessen wurden; untere Spur: Rechtecklichtreiz; L_{an} , L_{aus} : Licht-An und Licht-Aus; absolute Lichtintensität: $2,7 \text{ mW/cm}^2$; Logarithmus der relativen Lichtintensität: $(\log \text{ rel Int}) = -1,5$;

groß sind wie die des On-Transienten. Die Steigung der Off-Kennlinie ist allerdings geringer als die der On-Kennlinie.

Die Form und das Zeitverhalten des Off-Transienten variieren dabei viel stärker in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Dies läßt vermuten, daß die synaptischen Eingänge für den Off-Transienten andere sind als diejenigen, die den On-Transienten generieren.

3.2.2. Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit Sinuslichtreizen

Durch Stimulation mit sinusförmigen Lichtreizen läßt sich das zeitliche Auflösungsvermögen der monopolaren Zellen untersuchen (Järviletho & Zettler 1971). Dabei werden durch die sinusförmigen Lichtreize in etwa sinusförmige Antworten hervorgerufen, die sich frequenzabhängig verhalten. Die Peak-zu-Peak Amplituden werden für zunehmende Reizfrequenzen immer kleiner (Abb. 5). Neben dieser Abnahme der Antwortamplituden findet auch eine Phasenverschiebung der Sinusantworten statt (Järviletho & Zettler 1971), die jedoch in diesem Zusammenhang nicht untersucht wurde.

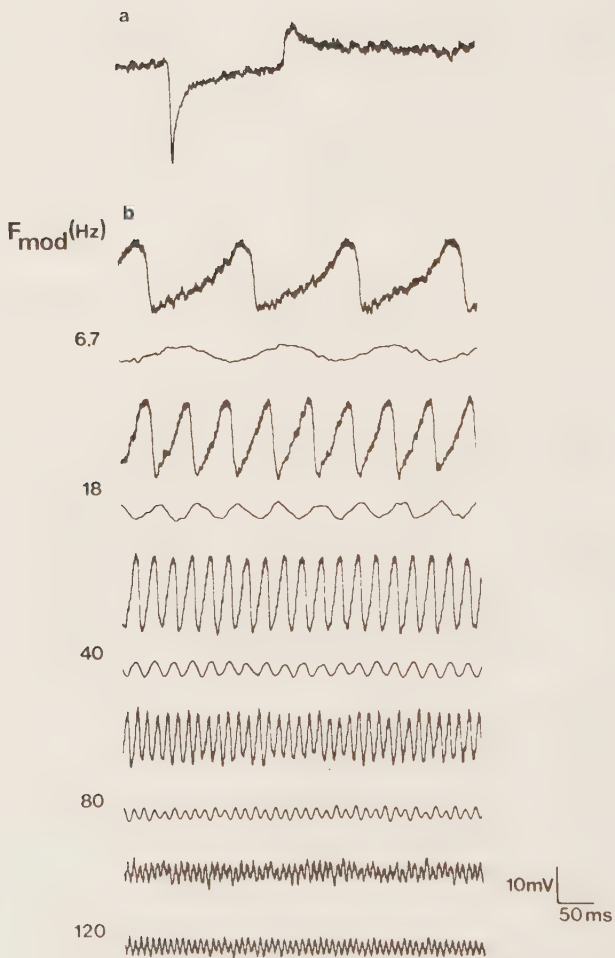


Abb 5: Antwort einer Monopolaren auf **a.** einen Rechtecklichtreiz **b.** sinusförmige Lichtstimuli verschiedener Frequenz. Jeweils obere Spur: postsynaptisches Potential; jeweils untere Spur: Lichtreiz; die Frequenz ist links angegeben; log rel Int = -1,5;

Abb. 6 zeigt den Frequenzgang des Antwortverhaltens einer Monopolaren bei drei verschiedenen Grundlichtintensitäten. Die einzelnen Meßpunkte stellen jeweils den Mittelwert von 10 Antwortamplituden bei der jeweiligen Frequenz dar. Dabei zeigt sich, daß sowohl die Amplituden als auch das zeitliche Auflösungsvermögen mit steigender Lichtintensität größer werden.

Bei jeder Intensität ähnelt der Frequenzgang einer Monopolaren dem eines technischen Tiefpaßfilters. Deshalb wurde zur Charakterisierung des Antwortverhaltens der -3 dB Punkt gewählt. Dies ist derjenige Wert, bei dem die Ausgangsspannung auf 1/2- $\sqrt{2}$ oder 70% des Maximalwertes abgefallen ist (Neher 1974).

Diese Kenngröße wurde zur Beschreibung des zeitlichen Auflösungsvermögens verwendet. Das heißt, als zeitliches Auflösungsvermögen wird diejenige Frequenz angegeben, bei der die Antwortamplitude nur mehr 70% der Maximalamplitude beträgt (Abb. 6). Die Bestimmung dieses Wertes erfolgte durch Interpolation der Kurvenpunkte per Hand. Die Maximalamplitude der Sinusantworten wird bei den Monopolaren, unabhängig von der Lichtintensität, bei einer Frequenz von etwa 15 bis 25 Hz erreicht.

Bei der Auftragung der -3 dB Werte gegen den Logarithmus der relativen Lichtintensität ergibt sich eine charakteristische Kennlinie (F-Int Kennlinie) (Abb. 7).

Bei kleineren Lichtintensitäten ist das zeitliche Auflösungsvermögen geringer als bei höheren Intensitäten.



Abb 6: Abhängigkeit des Logarithmus der Peak-zu-Peak Amplitude einer Monopolaren vom Logarithmus der Frequenz der sinusförmigen Lichtreize; drei verschiedene Lichtintensitäten sind dargestellt: log rel Int a: -0.9; b: -2.1; c: log rel Int = -3; die gestrichelten Linien geben jeweils den 70%-Wert als Kenngröße für das zeitliche Auflösungsvermögen an; Inset: PSP der gleichen monopolaren Zelle auf Rechteckstimuli der gleichen Intensitäten;

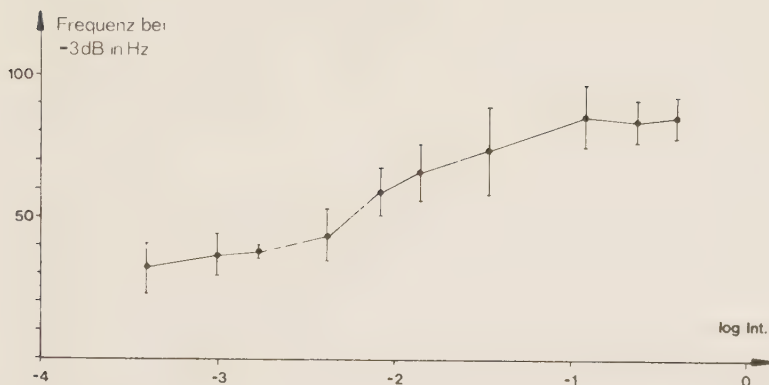


Abb 7: Abhängigkeit des zeitlichen Auflösungsvermögens dargestellt als -3dB Frequenz der Modulationskennlinie vom Logarithmus der Lichtintensität; dargestellt sind auch die Standardabweichungen der einzelnen Meßpunkte (n= jeweils 5);

Nach einem Anstieg bei mittleren Intensitäten geht die Kennlinie, wie bei den On- und Off-Kennlinien (U-Int Kennlinien) bei einer relativen Lichtintensität von $>10^{-1}$ in einen Sättigungsbereich über. Der Maximalwert des zeitlichen Auflösungsvermögens liegt dabei zwischen 90 Hz und 100 Hz.

3.2.3. Einzelelektrodenableitungen bei Stimulation mit ringförmigen Lichtreizen

Die Stimulation des Umfeldes erfolgte mittels Ringreizen. Die Ringe hatten einen inneren Durchmesser von 9° und einen äußeren Durchmesser von 11° . Bei dieser Ringgröße wurde der größte Unterschied in den Potentialantworten der Monopolaren beobachtet.

Zuvor wurde das Zentrum des rezeptiven Feldes der Monopolaren mit einem punktförmigen Licht bestimmt. Für alle untersuchten Zellen wurden jeweils die U-Int Kennlinien des On- und Off-Transienten für beide Reizsituationen bestimmt (Abb. 8).

Während die Kennlinie des On-Transienten für Ringreize gegenüber der für Punktreize zu niedrigeren Werten hin verschoben ist, ist beim Off-Transienten der Unterschied der Kennlinien für Punkt- bzw. Ringreize nur sehr gering. Das heißt, die Antwortamplituden des On-Transienten sind bei Stimulation mit Ringreizen wesentlich kleiner als bei Stimulation mit Punktreizen. Beim Off-Transienten sind die Antwortamplituden bei Reizung mit ringförmigen Lichtimpulsen nur geringfügig kleiner als die bei Reizung mit punktförmigen Lichtimpulsen. Ein kleiner depolarisierender On-Peak bei Stimulation mit Ringreizen, wie in anderen Arbeiten beschrieben, konnte in keinem Fall beobachtet werden (Zettler & Weiler 1976).

Durch die unterschiedliche Empfindlichkeit von On- und Off-Transient gegenüber Punkt- und Ringreizen wird die Annahme unterschiedlicher Inputs für beide Potentialanteile wahrscheinlich. Sowohl bei Punkt- als auch bei Ringreizung ist nicht bekannt wieviele Ommatidien gereizt werden. Aus diesem Grund kann der Umfeldanteil an der Generierung des Off-Transienten nicht genau räumlich bestimmt werden.

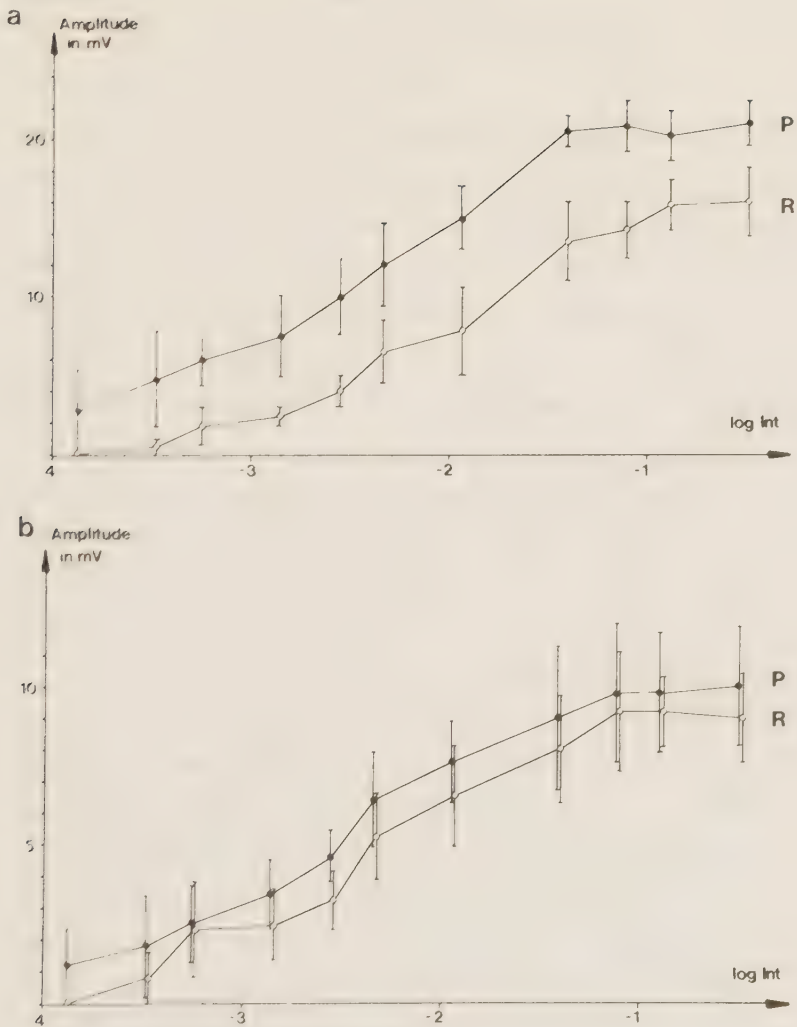


Abb 2: U-Int Kennlinie von a. On-Transient und b. Off-Transient des lichtinduzierten Potentials von monopolaren Zellen bei on-axis Stimulation mit punktförmigen (P) und ringförmigen (R) Lichtimpulsen; die Standardabweichungen sind ebenfalls eingetragen (n=6); a. signifikanter Unterschied der Mittelwerte von P und R auf dem 2% Niveau; b. Verlässlichkeit für den Unterschied der Mittelwerte von P und R ist kleiner als 80%;

3.2.4. Widerstandsverhalten der monopolaren Zellen. während des lichtinduzierten Potentials

Wie schon in 'Material und Methoden' beschrieben, wurde die Änderung des Membranwiderstandes während eines lichtinduzierten Potentials über den Spannungsabfall eines applizierten Strompulses berechnet. Dazu wurde ein einzelner Strompuls von 10 ms Dauer und einer Stromstärke von $\pm 0,5$ nA verwendet, der während verschiedener Phasen des postsynaptischen Potentials gegeben werden konnte (Abb. 9).

Dadurch war die Messung des Widerstandes an jeder beliebigen Stelle des Potentials möglich. Die verwendete Stromstärke und die Länge der Strompulse wurde deshalb so gering gewählt, um eine Vorpolarisation der Membran möglichst zu vermeiden.

Die Bridge Balance wurde auf dem Ruhemembranwiderstand abgeglichen. Bei einer Änderung des Membranwiderstandes ist die Bridge Balance nicht mehr abgeglichen, was einen Spannungsabfall während des Testsignals zur Folge hat. Bei einer Erhöhung des Membranwiderstandes müßte sich für negative Strompulse ein negativer und für positive Strompulse ein positiver Spannungsabfall ergeben. Bei einer Erniedrigung des Membranwiderstandes entsprechend umgekehrt.

Für positive Strompulse ergab sich ein negativer Spannungsabfall während des applizierten Testsignals bei allen drei Phasen des PSPs (On-Transient, Plateau, Off-

Transient), für negative Strompulse ein positiver Spannungsabfall. Das heißt also, daß der Membranwiderstand während jeder der drei Phasen der lichtinduzierten Antwort geringer ist als im dunkeladaptierten Zustand. Aus dem Spannungsabfall während des Testsignals und der Höhe des Strompulses wurde die Widerstandsänderung ΔR berechnet.

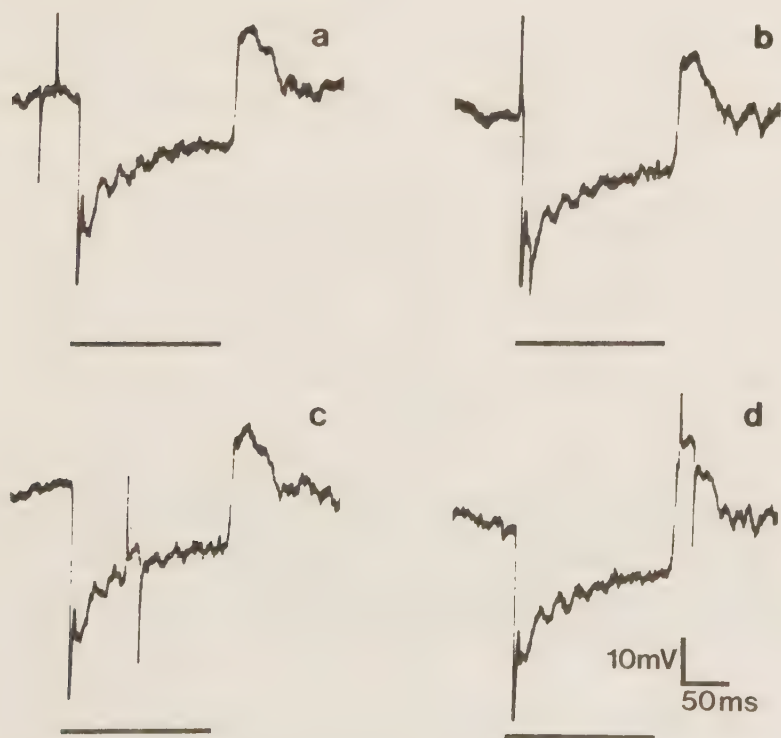


Abb 9: Lichtantwort einer Monopolaren auf einen Rechtecklichtreiz und Messung des Widerstandsverhaltens. Ein 10 ms langer Strompuls von $-0,5$ nA, der an jede beliebige Stelle der repetitiv erzeugten Potentiale verschoben werden konnte; a. Testimpuls vor der Lichtantwort, Elektrodenwiderstand auf null balanciert; die kapazitiven Zacken deuten das Ein- und Ausschalten des Stromes an; b. Testimpuls auf dem On-Transienten; c. Testimpuls auf dem Plateau; d. Testimpuls auf dem Off-Transienten; Balken: Lichtimpuls; log rel Int = $-1,5$;

Trägt man die Widerstandsänderung ΔR zeitlich synchron zur Lichtantwort auf, so erhält man einen zeitlichen Verlauf, der während des On-Transienten und des Plateaus dem der Lichtantwort entspricht (Abb. 10).

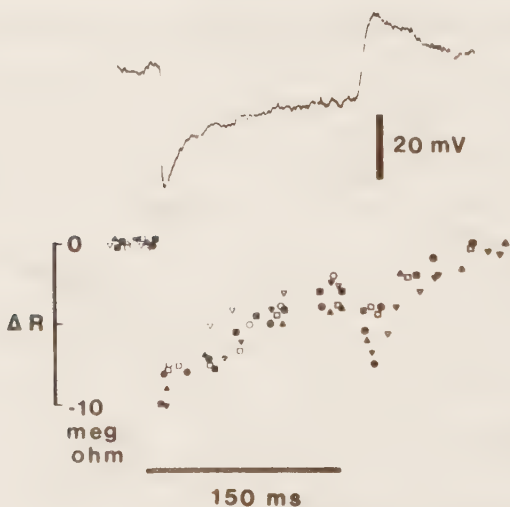


Abb 10: Widerstandsverhalten einer Monopolaren während eines Rechtecklichtreizes. Das Diagramm unter dem postsynaptischen Potential (obere Spur) veranschaulicht die Änderung des Membranwiderstandes ΔR , zu verschiedenen Zeitpunkten der lichtinduzierten Antwort der monopolaren Zelle. Die Auftragung erfolgte zeitlich synchron zu dem darüber befindlichen postsynaptischen Potential. Der zeitliche Verlauf ist das Ergebnis der Messungen bei 7 Zellen; $\log \text{rel Int} = -1.5$;

Am Off-Transienten findet nochmals ein Widerstandsabfall statt. Während des On-Transienten ist der Widerstandsabfall mit ca. 8 M Ω am größten. Anschließend steigt der Widerstand wieder an, hängt aber kurz vor Ende des Lichtreizes noch ca. 3 M Ω unter dem Ruhemembranwiderstand. Während des Off-Transienten fällt er wieder auf

max. 6 M Ω unter den Ruhemembranwiderstand ab. Danach erfolgt eine langsame Rückkehr zum Ruhemembranwiderstand. Daraus folgt, daß sowohl der On- als auch der Off-Transient auf ein Öffnen von Ionenkanälen zurückzuführen ist, die die Erniedrigung des Ruhemembranwiderstandes bewirken. Während dies beim On-Transienten aller Wahrscheinlichkeit nach Cl⁻-Kanäle sind, ist dies beim Off-Transienten noch ungeklärt (Zettler & Straka 1987).

3.2.5. Latenzzeiten von On- und Off-Transient

Durch Untersuchung der Latenzzeiten des On- und Off-Transienten bei monopolaren Zellen und Photorezeptoren lassen sich Aussagen über die synaptische Verzögerung der jeweiligen Potentialanteile machen.

Die Latenzzeit ist definiert als die Zeitdifferenz zwischen Reizbeginn bzw. Reizende und dem Einsetzen der Potentialantwort der Zelle. Beim On-Transienten wurde als Beginn der Reizantwort der Schnittpunkt des Ruhepotentials mit der Steigungsgeraden des On-Transienten, beim Off-Transienten der Schnittpunkt des Plateaupotentials mit der Steigungsgeraden des Off-Transienten verwendet (Abb 11).

Trägt man die Latenzzeiten des On-Transienten von Photorezeptoren und Monopolaren gegen die Dauer des Lichtreizes auf, so ergibt sich aus der Differenz der beiden Geraden ein synaptischer Delay des On-Transienten der Monopolaren von etwa 1ms, wobei dieser Wert, wie zu

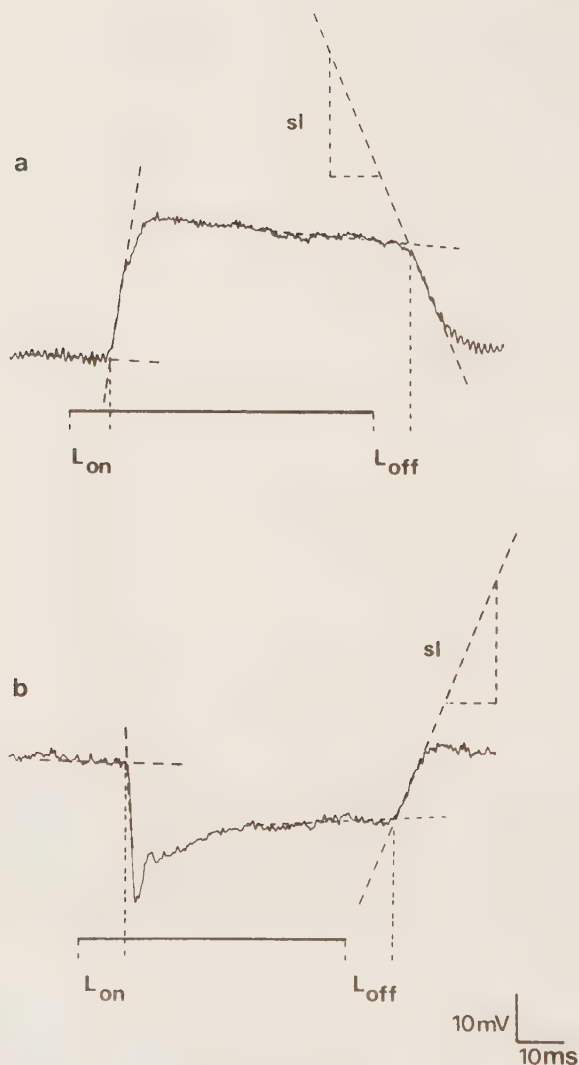


Abb 11: Lichtinduziertes Potential **a.** eines Photorezeptors und **b.** einer monoparen Zelle; der Balken unter den Potentialantworten gibt jeweils die Länge des Lichtreizes an; eingezeichnet sind die Steigungen (sl) der beiden Off-Transienten (jeweils 2,4 mV/ms) und der Beginn der On- und Off-Transienten (gestrichelte Linien); die Differenz zum Reizbeginn bzw. Reizende ist die Latenzzeit von On- und Off-Transient (L_{on}, L_{off}); log rel Int = -1,5;

erwarten, relativ unabhängig von der Lichtreizlänge ist (Abb. 12a).

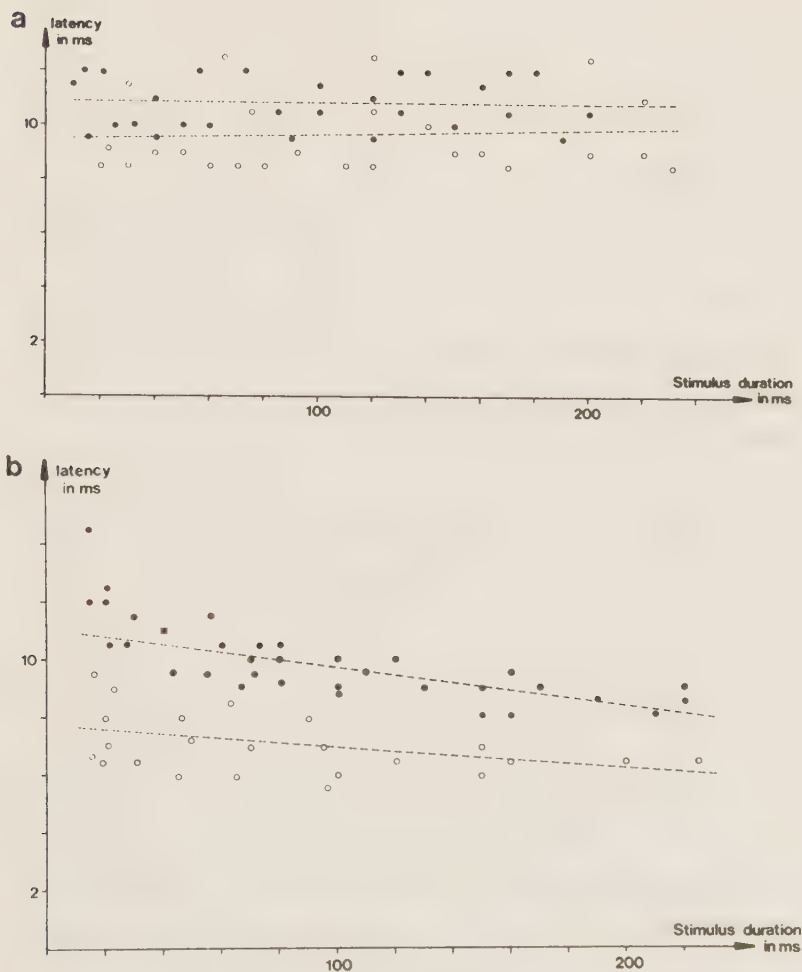


Abb 12: Abhängigkeit der Latenzzeit des **a.** On-Transienten und **b.** Off-Transienten von Photorezeptoren (○) und monopolaren Zellen (●) von der Länge der Lichtreize (n=7); die gestrichelte Linie ist jeweils die Ausgleichsgerade durch die einzelnen Meßwerte; die Differenz zwischen den beiden Geraden ergibt jeweils den synaptischen Delay;

Bei der Auftragung der Latenzzeiten des Off-Transienten von Photorezeptoren und monopolaren Zellen gegen die Dauer des Lichtreizes ergibt sich aus der Differenz der beiden Ausgleichsgeraden ein synaptischer Delay von etwa 2-3ms bei einer Standardlichtreizlänge von 150ms. Bei kürzeren Lichtimpulsen wird dieser Wert sogar noch etwas größer (Abb. 12b).

Der längere synaptische Delay des Off-Transienten gegenüber dem On-Transienten legt den Schluß nahe, daß die Information für den Off-Transienten der monopolaren Zellen über mehrere Synapsen läuft, wenn man annimmt, daß die Länge der synaptischen Latenz solcher Synapsen in der Regel etwa 1ms beträgt (Llinás 1987).

3.3. Intrazelluläre Ableitungen von monopolaren Zellen unter Beeinflussung der synaptischen Transmission

3.3.1. Vorbemerkungen zu den pharmakologischen Versuchen

Um einerseits das hohe zeitliche Auflösungsvermögen der monopolaren Zellen weiter zu untersuchen und andererseits die Herkunft des Off-Transienten aufklären zu können, waren pharmakologische Versuche notwendig, deren Ziel es war Substanzen zu finden, die die Generierung des normalen postsynaptischen Potentials beeinflussen. Die Tatsache, daß die L1-L2 Neurone nicht nur zu den Photorezeptoren R1-6 postsynaptisch sind, sondern auch von den Interneuronen L4, C2 und C3 synaptische Eingänge erhalten

(Strausfeld 1984), macht es wahrscheinlich, daß die Lichtantwort der Monopolaren durch verschiedene Pharmaka beeinflussbar ist.

Im Zentralnervensystem von Invertebraten ist inzwischen eine Vielzahl von Transmitterkandidaten bekannt. Davon wurden die monopolaren Zellen nur auf diejenigen hin untersucht, auf die in früheren Arbeiten über das periphere visuelle System der Insekten bereits hingewiesen wurde (Histamin: Callec 1985; Elias & Evans 1983; Hardie 1987,1988; Nässel et al 1988; GABA: Autrum & Hoffmann 1957; Chappell & Dowling 1972; Campos-Ortega 1974; Stone & Chappell 1981; Datum et al 1986; Meyer et al 1986; Acetylcholin: Klingman & Chappell 1978;).

Um eine mögliche Rolle bestimmter Transmitter zu untersuchen, wurden neben den Agonisten auch Antagonisten appliziert. Die Applikation der Antagonisten erfolgte solange, bis eine Wirkung auf das lichtinduzierte Potential sichtbar wurde. Zeigte eine Substanz auch bei wiederholten Versuchen keine Wirkung, so wurde sie als wirkungslos eingeordnet.

Bei den meisten abgeleiteten Zellen gelang es, die Transmitterblocker wiederholte Male mit der gleichen Wirkung zu applizieren, nachdem die Wirkung auf das PSP jeweils wieder abgeklungen war.

Bei agonistisch wirkenden Substanzen wurden nur 1-2 s dauernde Strompulse zur Iontophorese verwendet, um eine mögliche Desensibilisierung der Rezeptoren zu vermeiden. Iontophoretische Applikation erlaubt es auch bei bekann-

ter 'transport number' nicht, eine genaue Konzentration der pharmakologischen Substanzen am Wirkort anzugeben, da die räumliche Verteilung der Pharmaka im Gewebe nicht bekannt ist. Des weiteren ist auch die 'transport number' im Ringer und im Gewebe unterschiedlich. In verschiedenen Studien wurde jedoch gezeigt, daß für eine gegebene Iontophoreseelektrode die Menge der jeweiligen applizierten Substanz linear zum Iontophoresestrom ist (Stone 1985).

3.3.2. Beeinflussung der cholinergen Transmission

3.3.2.1. Acetylcholin

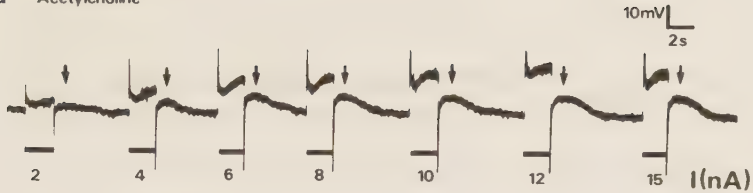
Abb. 13a zeigt Antworten einer monopolaren Zelle auf Acetylcholin (ACh), das mit 2 s langen positiven Strompulsen zunehmender Höhe appliziert wurde.

Alle untersuchten Zellen reagierten auf Acetylcholinpulse mit Depolarisationen, deren Höhe von den injizierten Ladungsmengen abhängig war.

Abb. 13b zeigt die Dosis-Antwortkurve von 6 Monopolaren für Acetylcholin, wobei die Antwortamplituden relativiert wurden. Die Maximalamplituden der Depolarisation betrugen $8,8 \pm 1,5$ mV ($n=6$) und wurden bei einer Stromstärke von 10-15 nA erreicht.

Bei 2 Zellen konnten, allerdings bei einer Ladungsmenge von 40-50 nC, Amplituden von 13-15 mV erreicht werden. Unterschiede in den Absolutamplituden sind wahrscheinlich

a Acetylcholine



b

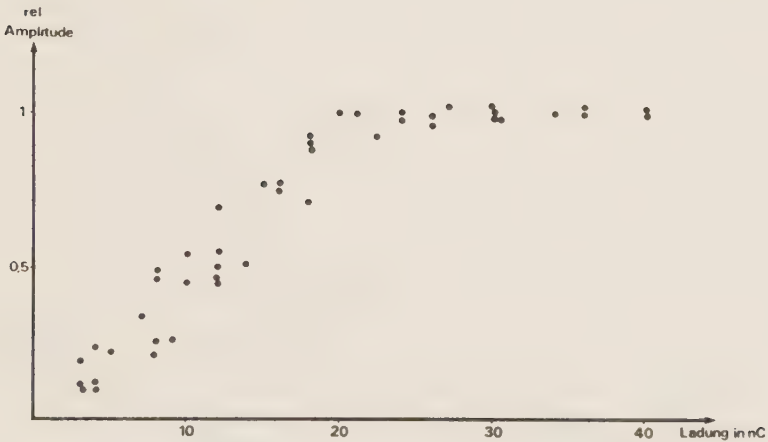


Abb. 13: **a.** Depolarisierende Antworten (Pfeile) einer monopolaren Zelle auf iontophoretisch appliziertes Acetylcholin; es wurden Pulse von 2 s Dauer (Balken) mit jeweils steigender Stromstärke verwendet; die Höhe der Strompulse in nA ist angegeben; die Spitzen zu Beginn und zum Ende jedes Pulses und die Verschiebung des Potentials während des Pulses sind Artefakte, die von den Strominjektionen herrühren; **b.** Dosis-Antwortkurve für iontophoretisch appliziertes Acetylcholin (n=6). Abszisse: Ladungsmenge der einzelnen Pulse; Ordinate: Amplituden der Monopolarenantwort in relativierten Einheiten bezogen auf die max. erreichbaren Depolarisationsamplituden;

in der jeweils unterschiedlichen Entfernung der Applikationselektrode zum Wirkort begründet. Lichtinduzierte Potentiale während acetylcholininduzierter Depolarisationen hatten bis zu 30% reduzierte On-Transienten. Auch der Off-Transient war verkleinert (Abb. 14).

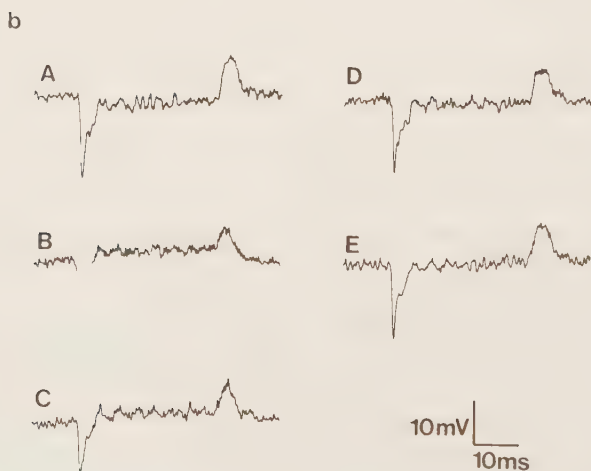
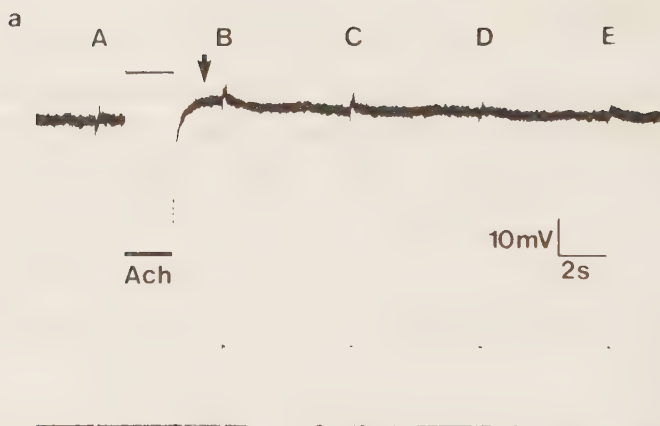


Abb 14: **a.** Depolarisierende Antwort einer Monopolaren (Pfeil) auf einen iontophoretisch applizierten Acetylcholinpuls (Ach) (obere Spur). Die Höhe des Strompulses betrug +15 nA. Gleichzeitig wurden lichtinduzierte PSPs ausgelöst (A-E); Lichtreize (untere Spur): log rel Int = -1,5; **b.** Lichtinduzierte Potentiale vor (A) und nach dem Acetylcholinpuls (B-E) mit höherer zeitlicher Auflösung dargestellt als in **a.**

Eine Verschiebung des Ruhepotentials in negativer Richtung, wie sie bei der Badapplikation von Acetylcholin beobachtet wurde, konnte bei iontophoretischer Applikation in keinem einzigen Fall festgestellt werden. (Datum 1987). Photorezeptoren zeigten auf die Acetylcholinpulse keine Reaktion.

3.3.2.2. Decamethonium und Hexamethonium

In Bindungsstudien an Extrakten aus dem Kopf der Stubenfliege *Musca domestica* zeigte Decamethonium eine hohe Affinität zu einem putativen cholinergen Rezeptor (Donnellan et al 1975; Mansour et al 1977). Dudai (1980) konnte bei Verhaltensversuchen zeigen, daß in Fliegen injiziertes Decamethonium als einziges von mehreren verschiedenen Pharmaka deutliche Verhaltenseffekte hervorrief. Hexamethonium verursachte ebenfalls eine Wirkung, wenn auch deutlich schwächer.

Sowohl Decamethonium als auch Hexamethonium sind Antagonisten der nikotinischen cholinergen Übertragung (Colquhoun & Rang 1976; Dudai 1978; Ascher et al 1978; Wang et al 1978; David & Satelle 1984; Satelle 1988).

Durch iontophoretische Applikation von Decamethonium konnte der Off-Transient des lichtinduzierten PSPs der monophasischen Zellen selektiv geblockt werden, während die Amplitude des On-Transients und des Plateaus nahezu unverändert blieb (Abb. 15,16; Straka & Zettler 1988).

Das Ruhemembranpotential zeigte nur geringe Schwankungen

auf Applikation von Deca- oder Hexamethonium. Alle 12 untersuchten Monopolaren reagierten gleich. Die Höhe der Reduktion des Off-Transients war von der Dauer und der Stromstärke des Pulses abhängig, und erste Anzeichen der Blockierung wurden schon bei einer injizierten Ladungsmenge von 5-10 nC sichtbar. Aufgrund der Elektrodenfüllung (1M NaAc und 10 mM Decamethonium) wurden jedoch nur 1% der Ladung von Decamethonium getragen, woraus eine hohe Empfindlichkeit der Monopolaren gegenüber diesem Antagonisten ersichtlich wird.

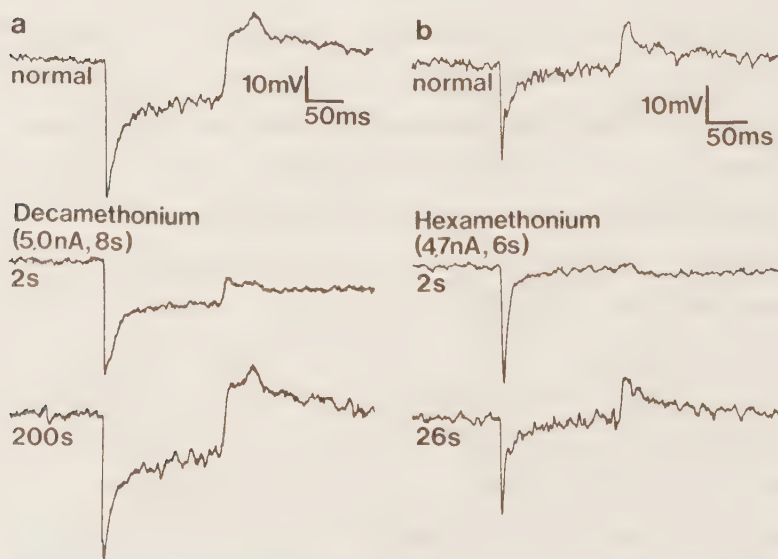


Abb 15: Veränderung der Lichtantwort einer monopolaren Zelle durch die cholinergen Antagonisten Decamethonium (a) und Hexamethonium (b). Der Off-Transient des PSP's wird von beiden Substanzen selektiv blockiert, während der On-Transient nahezu unbeeinflusst bleibt. Obere Spur: PSP vor der Applikation; mittlere Spur: 2s nach Ende der Applikation; Dauer und Höhe der Strompulse ist angegeben; untere Spur: nach Wiederherstellung des Normalpotentials; die Zeitdauer nach Ende der Applikation ist angegeben; log rel Int = -1,5;

Eine nahezu völlige Reduktion des On-Transienten, wie sie in anderen Arbeiten bei Applikation von Decamethonium beschrieben wurde (Datum 1987; Hardie 1988), konnte nur in zwei Fällen beobachtet werden. Dabei mußte allerdings die 10-100-fache Ladungsmenge, die zur völligen Reduktion des Off-Transienten nötig war, appliziert werden.

Zwar zeigte Hexamethonium die gleiche Reaktion wie Decamethonium, doch war die Regenerationszeit des PSPs nach Applikation von Decamethonium etwa 8 mal so lang (Abb. 16, 6 Zellen). Bei vielen Ableitungen war es möglich, die Injektionen mehrmals mit gleicher Wirkung durchzuführen, nachdem sich das PSP wieder erholt hatte.

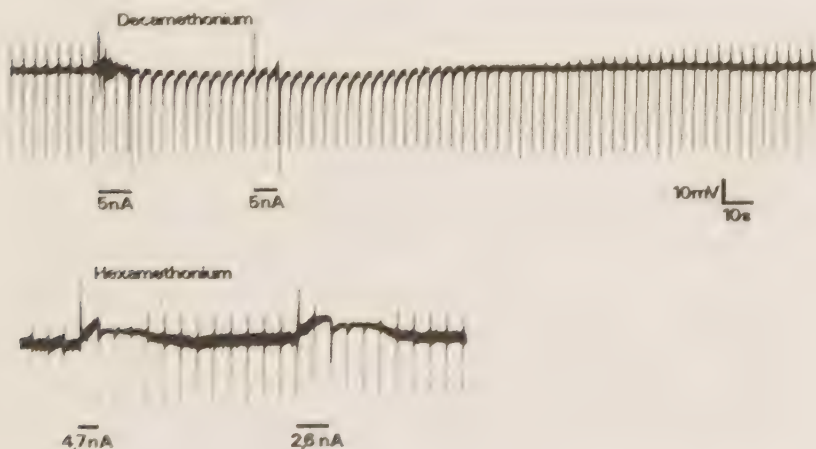


Abb 16: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Monopolaren auf Applikation von Decamethonium (oben) bzw. Hexamethonium (unten) und der anschließenden Erholung des monopolaren Potentials; durch Applikation von Hexamethonium wird das Ruhemembranpotential um etwa 4 mV depolarisiert; dieser Effekt konnte jedoch sonst bei keiner anderen Zelle beobachtet werden; Länge und Höhe der Iontophoresestrompulse ist angegeben; $\log \text{rel Int} = -1,5$;

Dies zeigt neben der hohen Reproduzierbarkeit dieses Effekts auch die Reversibilität der antagonistischen Wirkung.

Auswirkungen der beiden cholinergen Antagonisten auf die Lichtantwort der Photorezeptoren konnten nicht festgestellt werden.

Geringe Dosen von Decamethonium und Hexamethonium können demnach spezifisch die Übertragung des Off-Transients blockieren.

3.3.2.3. Atropin und Curare

Curare ist als äußerst potenter Antagonist der nikotinischen cholinergen Rezeptoren sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten bekannt (Wang et al 1978; Prives 1980; Breer 1981; David & Satelle 1984; Satelle 1985).

Atropin gilt als potenter Blocker der muscarinen cholinergen Rezeptoren bei Vertebraten und Invertebraten (Yamamura & Snyder 1974; Strange et al 1978; Gilbert et al 1979; Breer 1981; Satelle 1985). Seine Spezifität scheint jedoch ebenso wie die von Curare nicht nur auf das Acetylcholinerge Transmittersystem beschränkt zu sein, sondern sich auch auf das Histaminerge auszudehnen (Hardie 1987, 1988).

Iontophoretische Applikationen von Curare oder Atropin zeigten gleiche Wirkungen auf das PSP der Monopolaren (jeweils 4 Zellen; Straka & Zettler 1988).

Beide Pharmaka reduzierten sowohl den On- als auch den Off-Transienten, während das Plateau bis über das Ruhemembranpotential anstieg (Abb. 17).

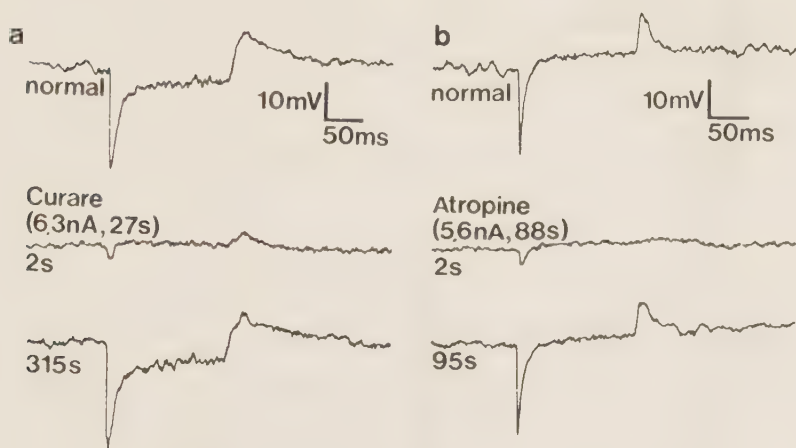


Abb 17: Effekt der Acetylcholinblocker Curare (a) und Atropin (b) auf das PSP der Monopolaren. Sichtbar ist eine nahezu völlige Reduktion sowohl des On- als auch des Off-Transienten. Obere Spur: vor Applikation; mittlere Spur: 2s nach Applikationsende; Dauer und Höhe der Stimpulse ist angegeben; untere Spur: nach Wiederherstellung des Normalpotentials; Zeitdauer nach Ende der Applikation ist angegeben; log rel Int = -1,5;

Bis auf eine Ausnahme, bei der das Ruhemembranpotential um 4 mV anstieg, blieb es bei allen Injektionen konstant. Das Membranrauschen wurde durch die Applikation sowohl von Curare als auch von Atropin geringer.

Sowohl Curare als auch Atropin reduzierten den On- und den Off-Transienten simultan (Abb. 18).

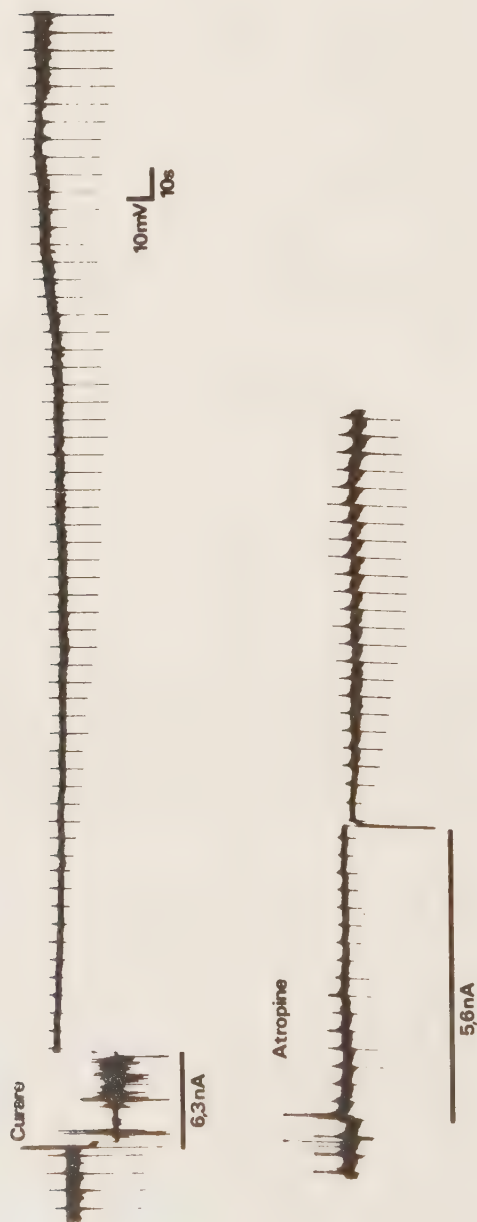


Abb 18: Zeitlicher Verlauf der Applikation von Curare (oben) bzw. Atropin (unten) und der anschließenden Wiederherstellung des PSPs. Länge und Höhe der Strompulse ist angegeben; log rel Int = -1,5;

Die Empfindlichkeit der Monopolaren, gemessen als benötigte Ladungsmenge zur Reduktion des Potentials, gegenüber Curare war jedoch etwa 60 mal so hoch wie die gegenüber Atropin, und auch die Wirkung von Curare war länger anhaltend (Abb. 18). Ein Effekt auf die Lichtantwort der Photorezeptoren konnte nicht beobachtet werden.

3.3.3. Beeinflussung der histaminergen Transmission

3.3.3.1. Ranitidin, Metiamid, Cimetidin, Promethazin

Mehrere neuere Arbeiten konnten zeigen, daß die Photorezeptoren der Komplexaugen, wie auch der Ocellen, möglicherweise Histamin als Transmitter verwenden (Hardie 1987, 1988; Simmons & Hardie 1988; Nässel et al 1988; Pirvola et al 1988; Schlemmermeyer et al 1989).

Bei *Calliphora* konnte Hardie (1987) durch iontophoretische Applikation von Histamin eine hyperpolarisierende Antwort der monopolaren Zellen auslösen, die in ihrer Amplitude und ihrem Zeitverhalten dem der hyperpolarisierenden Komponente des lichtinduzierten PSP's ähnelte. Allerdings konnten Histaminblocker das lichtinduzierte PSP nur in geringem Maße beeinflussen. Die durch iontophoretisch appliziertes Histamin ausgelöste Antwort konnte jedoch blockiert werden. Um eine tatsächliche Beteiligung von Histamin an der synaptischen Transmission der Photorezeptoren auf die monopolaren Zellen nachzuweisen, wurden histaminerge Antagonisten appliziert.

Histaminrezeptoren lassen sich 3 verschiedenen Typen zuordnen, nämlich H1, H2 und H3, wobei die H3-Rezeptoren Autorezeptoren sind, die an der präsynaptischen Seite auf die Histaminausschüttung wirken (Schwartz et al 1986; Green 1987; Arrang et al 1987).

Für die Untersuchung einer histaminergen Wirkung auf die Monopolaren wurden der H1-Blocker Promethazin und die H2-Blocker Ranitidin, Metiamid und Cimetidin verwendet.

Ähnlich wie bei der neueren Arbeit von Hardie (1988) konnte mittels iontophoretischer Applikation von Ranitidin und Metiamid das PSP der monopolaren Zellen nahezu vollständig geblockt werden (Abb.19; Straka & Zettler 1988).

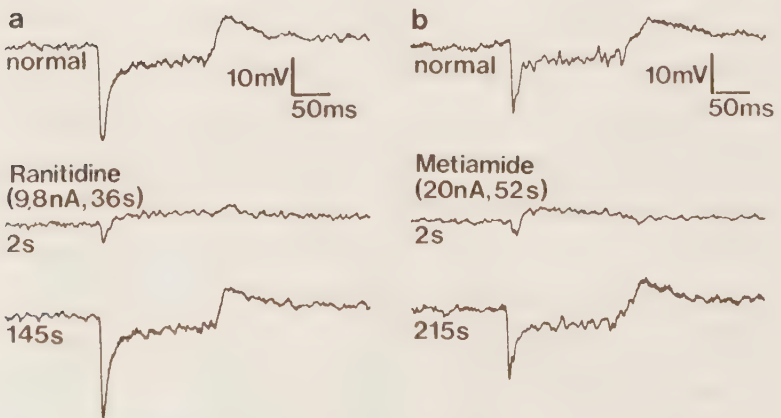


Abb 19: Effekt der Histamin H2-Blocker Ranitidin (a) und Metiamid (b) auf das PSP der Monopolaren. Sichtbar ist eine nahezu vollständige Reduktion sowohl des On- als auch des Off-Transienten. Obere Spur: PSP vor der Applikation; mittlere Spur: 2s nach Ende der Applikation; Dauer und Höhe des Strompulses ist angegeben; untere Spur: nach Wiederherstellung des Normalpotentials; Zeitdauer nach Ende der Applikation ist angegeben; log rel Int = -1,5;

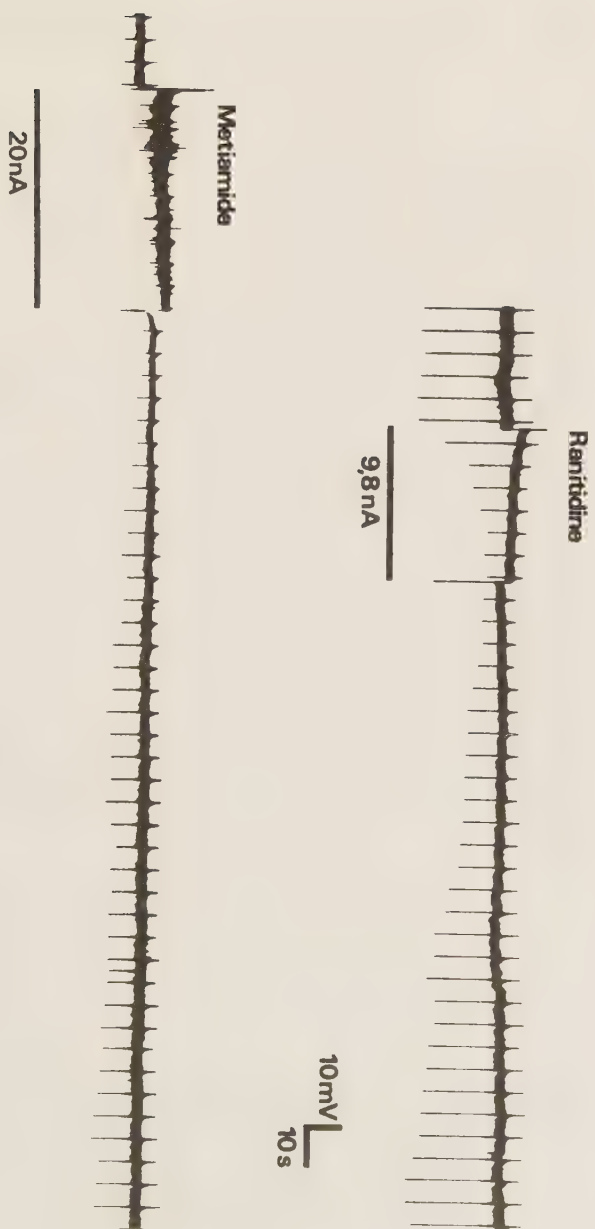


Abb 20: Zeitlicher Verlauf der von Ranitidin (oben) bzw. Metiamid (unten) und der anschließenden Wiederherstellung des Normalpotentials; Länge und Höhe der Strompulse ist angegeben; $\log \text{rel Int} = -1,5$

Beide Substanzen verursachten eine gleichzeitige Reduktion der Amplitude des On- und des Off-Transienten und eine Verschiebung des Plateaus nach oben (Abb. 19,20). Das Ruhepotential zeigte nur in 2 Versuchen einen geringfügigen Anstieg von etwa 3 mV. Nach jeder Applikation konnte jedoch ein vermindertes Rauschen des Ruhemembranpotentials beobachtet werden. Ranitidin war etwa 6 mal so effektiv wie Metiamid (n=5).

Aufgrund der von Versuch zu Versuch verschieden langen Zeitdauer für die Erholung des PSP's nach Applikation der Pharmaka kann hierfür kein Unterschied zwischen den beiden Antagonisten angegeben werden.

Während Cimetidin, ein weiterer H₂-Blocker, in 2 von 3 Versuchen eine geringfügige Reduktion des On-Transienten auslöste, rief der H₁-Blocker Promethazin in keinem Fall (n=4) eine Wirkung hervor.

Ableitungen von Photorezeptoren zeigten keine Veränderungen der Lichtantwort auf die Applikation der oben genannten Histaminantagonisten hin.

3.3.4. Beeinflussung der GABAergen Transmission

3.3.4.1. GABA

Durch immunocytochemische Untersuchungen im Komplexauge von *Calliphora* und *Musca* konnten zwei verschiedene GABAerge Zelltypen bestimmt werden (Datum et al 1986; Meyer et al 1986). Dies sind zum einen die efferenten C2-

Fasern, die zu den monopolaren Zellen präsynaptisch sind, (Strausfeld 1984) und zum anderen die langen Photorezeptoren R7.

Abb. 21a zeigt die Antwort einer Monopolaren auf iontophoretisch appliziertes GABA mit steigender Höhe der Strompulse.

Die Applikation erfolgte wie bei Acetylcholin mittels positiver Strompulse von 2s Dauer. Dabei reagierten die Zellen ebenfalls mit Depolarisationen, die nach den Strompulsen einsetzten. Allerdings dauerten die durch GABA ausgelösten Depolarisationen doppelt so lang wie die durch Acetylcholin ausgelösten. Diese Tatsache läßt auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen der beiden Transmitter schließen.

Die Maximalamplituden der GABAantworten betrugen $6,3 \pm 1,7$ mV (n=5) und wurden bei Stromstärken von 7-9 nA erreicht.

Abb. 21b zeigt die Dosis-Antwortkurve für die GABAinduzierten Depolarisationen von 6 Monopolaren. Die Antwortamplituden wurden ebenfalls wieder relativ zum maximal erreichbaren Depolarisationswert dargestellt.

Lichtinduzierte Potentiale während der durch GABA ausgelösten Depolarisationen zeigten bis zu 60% reduzierte On- und Off-Transienten (Abb. 22).

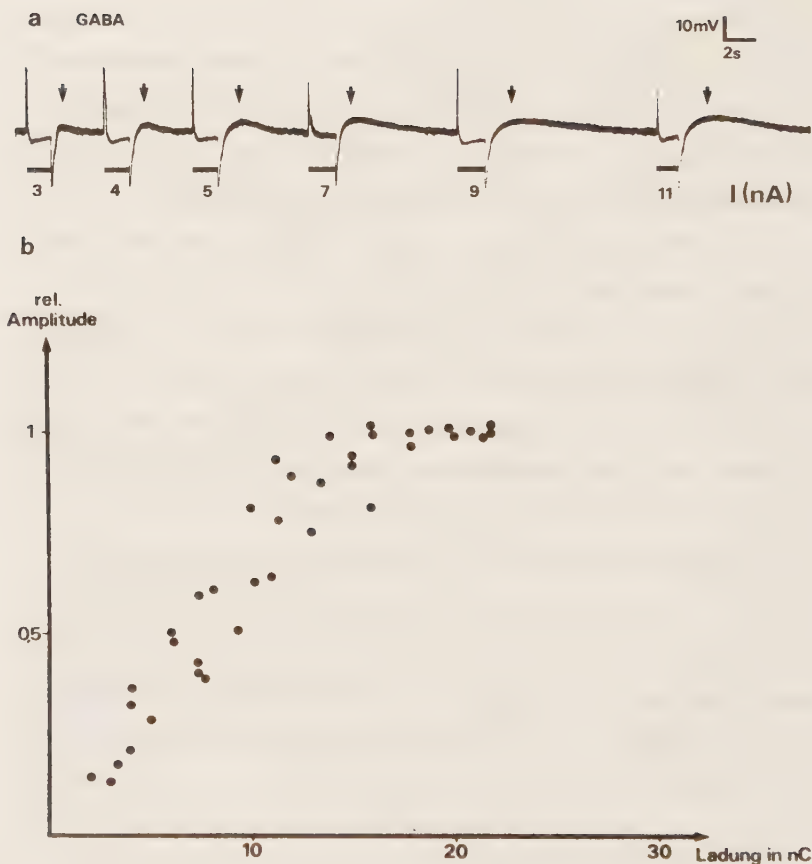


Abb 21: **a.** Depolarisierende Antworten (Pfeile) einer Monopolaren auf iontophoretisch applizierte GABApulse. Es wurden 2s Pulse (Balken) mit jeweils steigender Stromstärke verwendet. Die Höhe der Strompulse in nA ist angegeben. Die positiven und negativen Spitzen zu Beginn und zum Ende jedes Pulses sind Artefakte und stellen die Ein- und Ausschaltzacken des Iontophoresestroms dar **b.** Dosis-Antwortkurve der Monopolarenantwort, die durch iontophoretisch appliziertes GABA ausgelöst wird (n=5). Abszisse: Ladungsmenge der einzelnen Pulse; Ordinate: relativierte Amplituden der Monopolarenantwort bezogen auf die max. erreichbare Depolarisation;

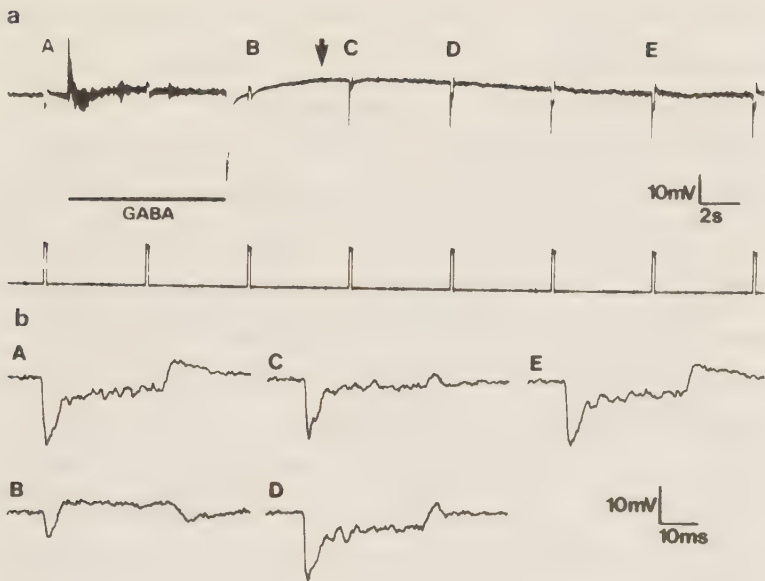


Abb 22: **a.** Depolarisation einer Monopolaren (Pfeil) auf einen GABApuls (obere Spur); die Höhe des Stimpulses beträgt +20 nA; gleichzeitig wurden Lichtreize gegeben (untere Spur): $\log \text{rel Int} = -1,5$; **b.** Lichtinduzierte Potentiale vor (A) und nach dem GABApuls (B-E) mit höherer zeitlicher Auflösung dargestellt als in **a.**

3.3.4.2. Bicucullin und Pikrotoxin

Die GABA-Rezeptoren bei Vertebraten lassen sich in GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren einordnen, während die Terminologie bei Invertebraten weniger klar ist (Hill & Bowery 1981; Simmonds 1983; Bormann 1988). Bicucullin und Pikrotoxin gelten beide als potente Antagonisten des GABA_A -Rezeptors, wobei die Wirkung von Pikrotoxin nicht kompetitiv ist (Johnston 1978; Simmonds 1983; Akaike et al 1985; Bormann 1988).

Auch bei Invertebraten zeigt Pikrotoxin eine potente nichtkompetitive Wirkung auf die GABA-Rezeptoren (Teichberg 1980; Lees et al 1987; Shimahara et al 1987; Eldefrawi & Eldefrawi 1987; Bormann 1988).

Bicucullin zeigt bei Insekten unterschiedliche Effekte. Während es im Nervengewebe von Heuschrecken und im Gehirn von Schaben keine Wirkung hat, konnte eine inhibitorische Wirkung auf die D_1 -Neurone von Schaben und im Thorax-muskel von Fliegen nachgewiesen werden (Abalis et al 1983; Satellite 1984; Breer & Heiligenberg 1985; Lees et al 1987; Shimahara et al 1987; Eldefrawi & Eldefrawi 1987).

Durch die iontophoretische Applikation von Bicucullin konnte, ähnlich wie mit Hexa- bzw. Decamethonium, selektiv der Off-Transient geblockt werden. Der On-Transient blieb dabei unverändert (Abb. 23,24; Straka & Zettler 1988). Für eine Wirkung des Bicucullins wurde jedoch eine höhere Ladungsmenge benötigt. Das Plateau reagierte auf die Applikation von Bicucullin mit einer Verkleinerung der Amplitude. Das Ruhepotential stieg nach der Applikation nur bei einer von drei abgeleiteten Zellen um 3-4 mV an. Der Anstieg des Ruhepotentials während der Applikation ist ein Artefakt der Strominjektion.

Eine Wirkung auf die Lichtantwort der Photorezeptoren konnte nicht beobachtet werden.

Pikrotoxin konnte iontophoretisch nicht appliziert werden und mußte deshalb durch Druckapplikation injiziert werden. Dabei wurden die Monopolaren aufgrund mechanischer Störungen jedoch fast immer verloren. Lediglich bei einer

Zelle gelang es, Pikrotoxin solange zu injizieren, bis eine Wirkung sichtbar wurde.

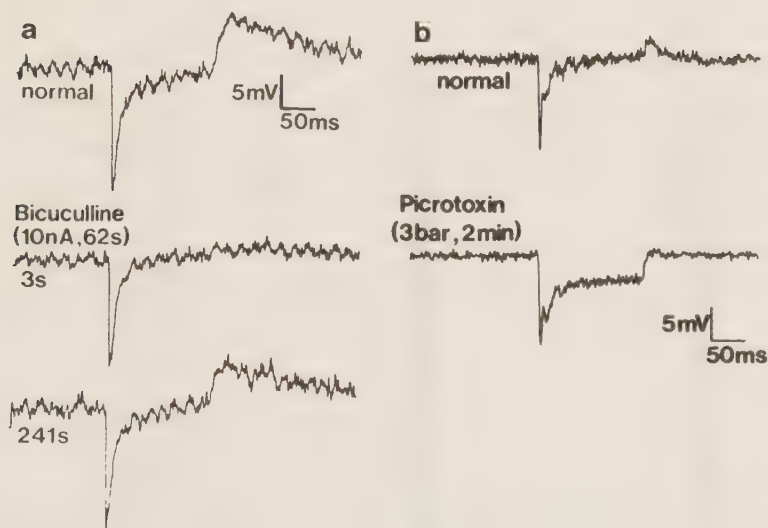


Abb. 23: Effekt der GABA-Blocker Bicucullin (a) und Pikrotoxin (b) auf das PSP von Monopolaren; der Off-Transient wird selektiv blockiert, während der On-Transient unverändert bleibt. Obere Spur: vor Applikation des Blockers; mittlere Spur: nach Ende der Applikation; Zeitdauer der Pulse und Stromstärke bzw. Druck sind angegeben; untere Spur: nach Wiederherstellung des Normalpotentials; Zeitdauer nach Ende der Applikation ist angegeben; da Pikrotoxin durch Druck appliziert werden mußte, wurde die Zelle aufgrund der mechanischen Störung, die diese Applikationsweise mit sich brachte, bald nach Ende der Injektion verloren; log rel Int = -1,5;

Abb. 24 zeigt den zeitlichen Verlauf der Antwort bei Druckapplikation von Pikrotoxin. Für die Injektion wurde ein Druck von 3 bar über 120s hinweg angelegt. Nach Sichtbarwerden eines Effektes ging die Ableitung der Zelle jedoch verloren.

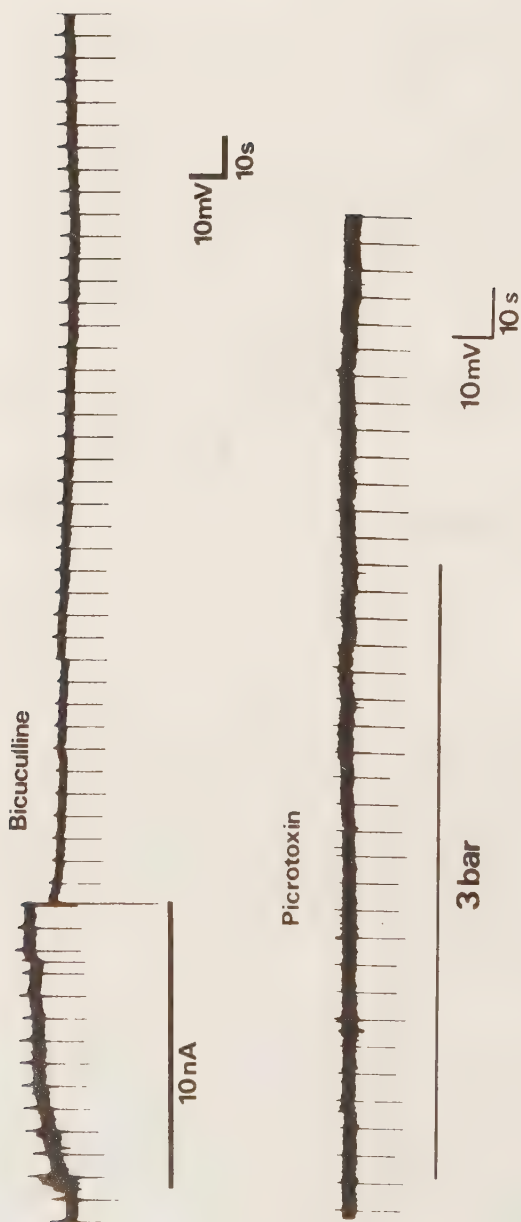


Abb 24: Zeitlicher Verlauf der Applikation von Bicucullin (oben) bzw. Picrotoxin (unten); die anschließende Wiederherstellung des Normalpotentials ist nur bei Bicucullin zu sehen, da die Ableitung unter Picrotoxinapplikation bald nach Ende der Injektion verloren wurde; Länge und Höhe des Strompulses bzw. der Druckapplikation sind angegeben; $\log \text{rel Int} = -1.5$;

Die Wirkung von Pikrotoxin äußerte sich ebenfalls in einer selektiven Reduktion des Off-Transienten (Abb. 23,24). Im Gegensatz zu Bicucullin vergrößerte sich aber die Amplitude des Plateaus um etwa 7 mV.

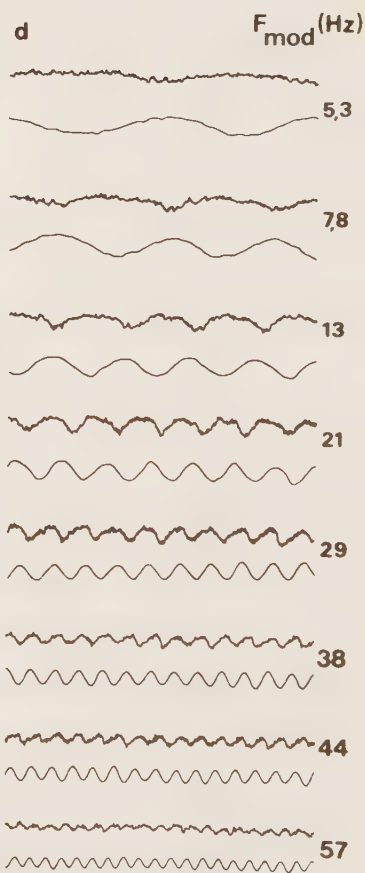
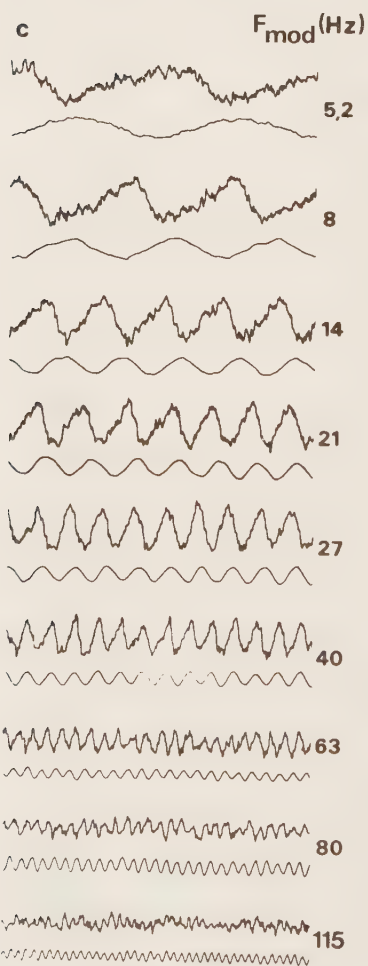
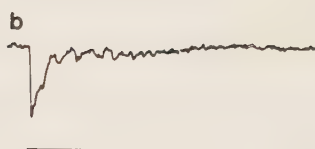
Aufgrund der unterschiedlichen Applikationsmethoden und der geringen Anzahl der Zellen ist ein Vergleich der Wirksamkeit von Pikrotoxin mit der der anderen getesteten Pharmaka allerdings nicht möglich.

3.4. Sinusförmige Lichtreizung unter pharmakologischer Beeinflussung des lichtinduzierten Potentials

3.4.1. Blockierung des Off-Transienten

Durch Applikation der Acetylcholinantagonisten Hexamethonium, Decamethonium und der GABAantagonisten Bicucullin und Pikrotoxin war es möglich, den Off-Transienten des durch einen rechteckförmigen Lichtimpuls ausgelösten PSPs selektiv zu blockieren.

Um das zeitliche Auflösungsvermögen der monophasischen Zellen näher zu untersuchen, wurden während des Zeitraums, in dem der Off-Transient geblockt war, sinusförmige Lichtreize verschiedener Frequenz angeboten. Für die Blockierung der Off-Antwort wurde Decamethonium verwendet, da die Wirkung dieses Antagonisten nach Applikation am längsten andauerte. Die Methode der Applikation war die gleiche, wie unter 3.3. beschrieben.



10mV
50ms

Abb. 25 zeigt die Antworten derselben Monopolaren auf Rechteck- und Sinusreize vor und nach Blockierung des Off-Transienten. Dabei sieht man deutlich, daß nach der Reduktion des Off-Transienten erstens die Amplituden der Antworten auf die Sinusreize wesentlich kleiner sind und zweitens die zeitliche Auflösung ebenfalls stark vermindert ist.

Dies wird deutlicher, wenn man die Peak-zu-Peak Antwortamplituden gegen die Frequenz der Sinusreize aufträgt (Abb. 26).

Die Peak-zu-Peak Antwortamplituden nach Applikation von Decamethonium und vollständigem Block ('Vollblock') des Off-Transienten waren nur mehr etwa ein Drittel so hoch wie die vor der Applikation. Außerdem war das zeitliche Auflösungsvermögen, ausgedrückt als -3dB Wert, um 12 Hz erniedrigt. Diese Erniedrigung ist zudem intensitätsabhängig. Trägt man die -3 dB Werte der Modulationsfrequenz der Monopolaren unter dem Einfluß von Decamethonium ('Vollblock') gegen die Lichtintensität auf, so erhält man eine im Vergleich zu normalen Verhältnissen veränderte Kennlinie des zeitlichen Auflösungsvermögens (Abb. 27).

←

Abb 25: Antwort derselben Monopolaren auf Rechtecklichtreize (a,b) und Sinuslichtreize (c,d); jeweils obere Spur bei c,d: postsynaptisches Potential; jeweils untere Spur: Lichtreiz; Frequenz der Sinusreize in Hz jeweils rechts neben den Potentialen; a,c: Potentiale vor Applikation von Decamethonium; b,d: Potentiale nach Applikation von Decamethonium (60s, +3nA); log rel Int = -2,4;

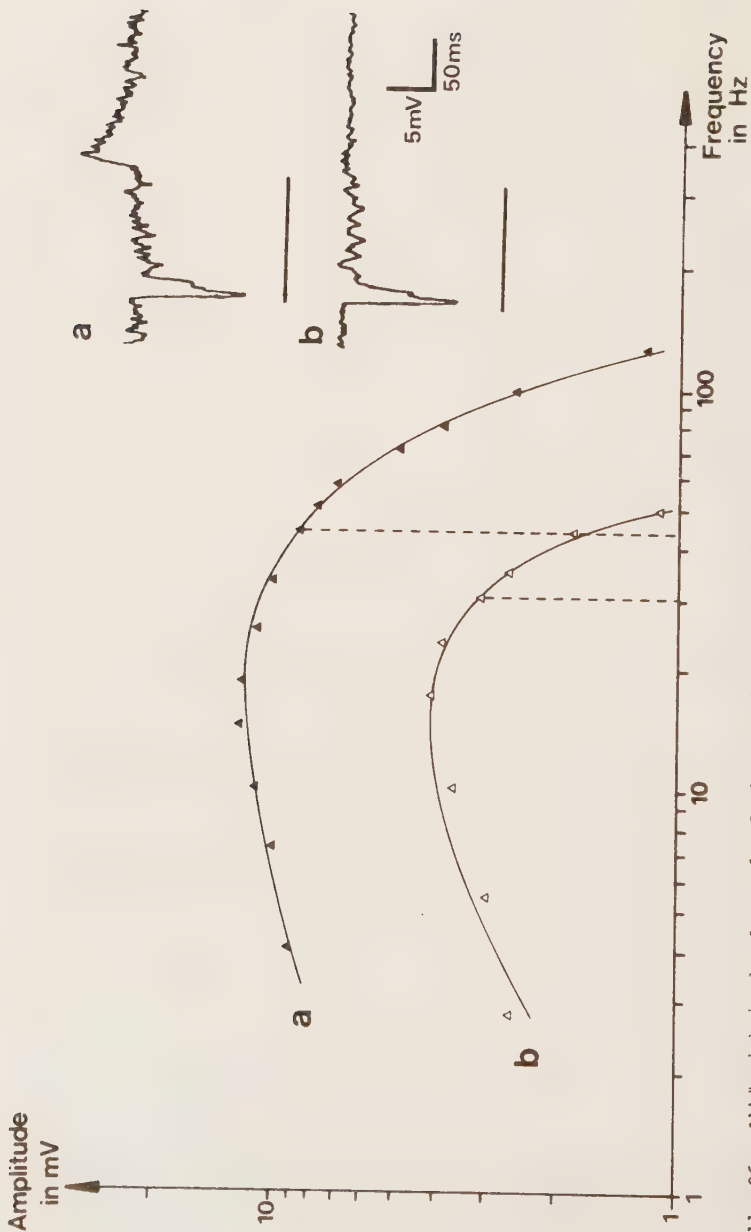


Abb 26: Abhängigkeit des Log. der Peak-zu-Peak Antwortamplitude vom Log. der Frequenz der Sinusreize; jeder Meßwert ist der Mittelwert von 10 Antwortamplituden bei der jeweiligen Frequenz; die gestrichelten Linien geben jeweils den -3dB Wert als Kenngröße für das zeitliche Auflösungsvermögen an: vor (a) und nach (b) Applikation von Decamethonium (60s, +3nA); Inset: durch Rechtecklichtreize induzierte PSPs derselben Zelle; a, b wie oben; log rel Int = -2.4;

Bei geringen Lichtintensitäten $<10^{-3}$ ist das zeitliche Auflösungsvermögen von decamethoniumbeeinflussten und von unbeeinflussten Zellen in etwa gleich (Abb. 27b). Bei unbeeinflussten Zellen steigt die Kennlinie des zeitlichen Auflösungsvermögens bei höheren Lichtintensitäten an und erreicht bei einer Intensität von etwa 10^{-1} eine Sättigung. Demhingegen fehlt dieser Anstieg bei den durch Decamethonium beeinflussten Zellen, so daß das zeitliche Auflösungsvermögen über den gesamten Intensitätsbereich hinweg relativ gering (zwischen 30-40 Hz) bleibt.

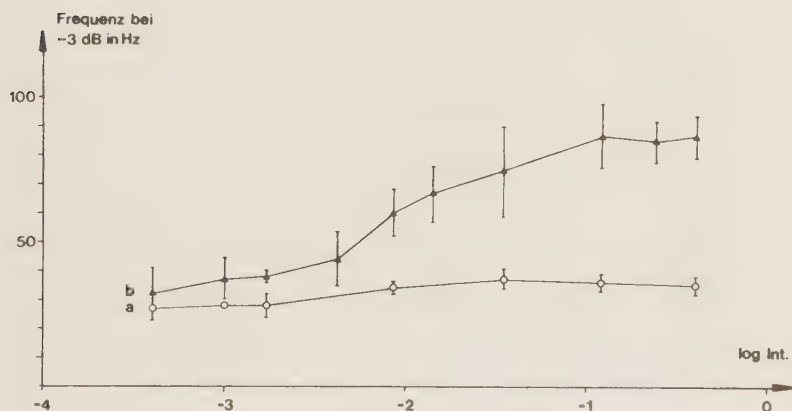
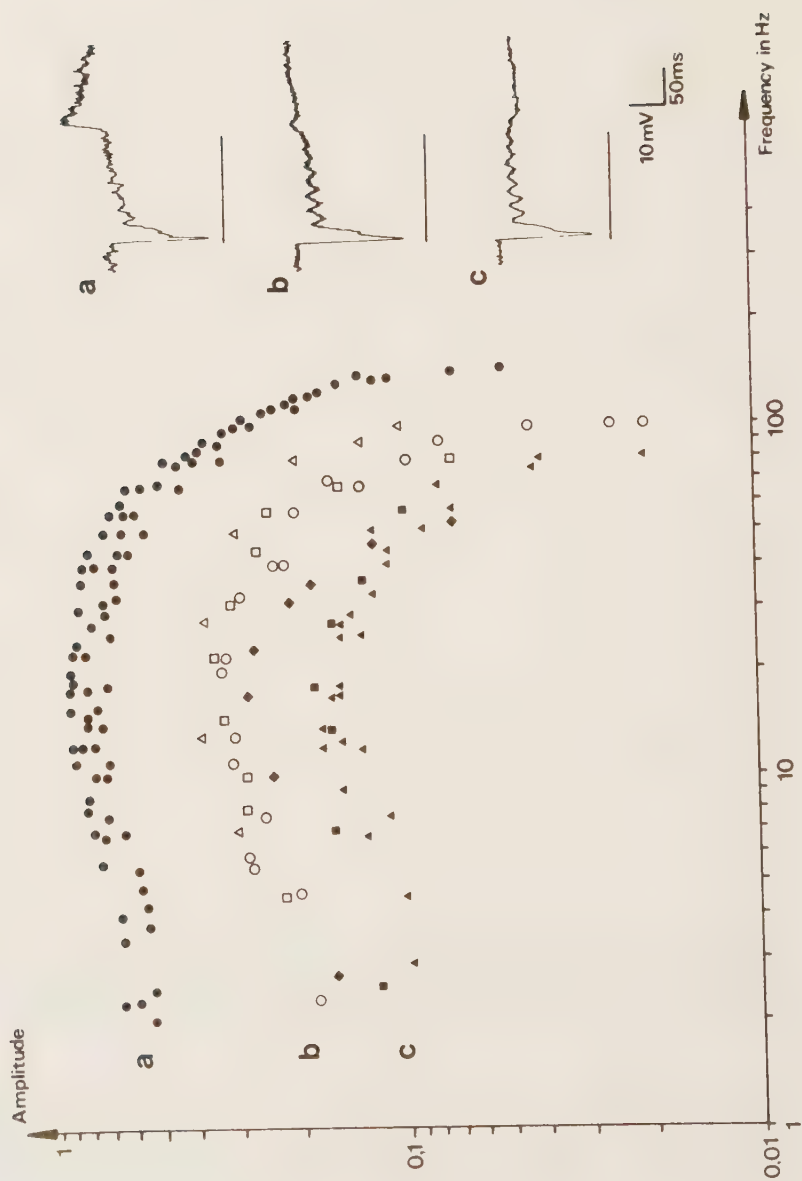


Abb 27: Abhängigkeit des -3 dB Wertes der Modulationsfrequenz vom Logarithmus der relativen Lichtintensität bei Zellen, deren licht-induziertes Potential durch Decamethonium beeinflusst wurde ('Vollblock') (a) und normalen Zellen (b); dargestellt sind auch die Standardabweichungen der einzelnen Meßpunkte (n= jeweils 3);

Durch geringere Dosen von Decamethonium war die Blockierung des Off-Transienten nur graduert bzw. unvollständig ('Teilblock') (Abb. 28 Inset).



Diesen Zellen wurden ebenfalls sinusförmige Lichtreize dargeboten. Allerdings war es schwieriger, das Ausmaß der Blockierung des Off-Transienten während der Sinusreize gleich zu halten. Abb. 28 zeigt die Abhängigkeit der Peak-zu-Peak Antwortamplituden von der Frequenz der Sinusreize bei unbeeinflussten Zellen (gefüllte Kreise), bei Zellen mit einer teilweisen Blockierung des Off-Transienten (offene dreiecke, Kreise und Quadrate) und bei Zellen mit völliger Blockierung des Off-Transienten (gefüllte Dreiecke, Quadrate und Rauten). Dabei ist zu erkennen, daß die Höhe der Antwortamplituden und das zeitliche Auflösungsvermögen bei 'teilgeblockten' Zellen zwischen den jeweiligen Werten der unbeeinflussten Zellen und denen der 'vollgeblockten' Zellen liegen.

Die Verringerung des zeitlichen Auflösungsvermögens und die Verkleinerung der durch sinusförmige Lichtreize induzierten Antwortamplituden bei monopolaren Zellen unter Decamethoniumeinfluß ist demnach abhängig von der Konzentration an appliziertem Decamethonium.



Abb 28: Abhängigkeit des Logarithmus der Peak-zu-Peak Antwortamplituden vom Logarithmus der Frequenz der sinusförmigen Lichtreize a bei unbeeinflussten Zellen, b und c bei durch Decamethonium beeinflussten Zellen; der Decamethoniumeinfluß ist an dem Grad der Reduktion des Off-Transienten erkennbar (Inset); die Antwortamplituden auf Sinusreize sind auf die Amplituden des On-Transienten bei Reizung mit rechteckförmigen Lichtimpulsen normiert; jeder Meßwert ist der Mittelwert von 10 Antwortamplituden bei der jeweiligen Frequenz; Inset: durch Rechtecklichtimpulse induzierte Potentiale von: a normalen Zellen, b und c durch Decamethonium beeinflussten Zellen; b 'Teilblock', c 'Vollblock'; $\log \text{rel Int} = -1,5$;

Allerdings erfolgt bei Erhöhung der Decamethoniumkonzentration die prozentuale Verringerung der Antwortamplitude in einem stärkeren Maße als die prozentuale Reduktion des zeitlichen Auflösungsvermögens.

Abb. 29 zeigt den zeitlichen Verlauf des PSPs auf Stimulation mit sinusförmigen Lichtreizen mit zunehmender Modulationsfrequenz bei einer Zelle mit normalem Potential und einer Zelle, deren Off-Transient durch Decamethonium völlig geblockt wurde.

Bei der unbeeinflussten Zelle (Abb. 29a) ist die depolarisierende Phase der Antwort auf die Sinusreize bei niedrigen und mittleren Reizfrequenzen (F_{mod} 0-60 Hz) jeweils genauso hoch wie der depolarisierende Off-Transient auf einen Rechtecklichtreiz. Die Amplitude der hyperpolarisierenden Phase der Antwort auf Sinusreize ist dagegen auf etwa ein Drittel der Amplitude des On-Transienten bei Rechtecklichtreizung reduziert.

Bei der Zelle, deren Potential durch Decamethonium beeinflusst wurde, schwingen die Antwortamplituden bei Reizung mit sinusförmigen Lichtimpulsen ebenfalls zwischen dem depolarisierten und einem hyperpolarisierten Wert. Der depolarisierte Wert ist durch den verkleinerten Off-Transienten gegeben, der hyperpolarisierte Wert ist vom Ruhemembranpotential aus gemessen geringfügig kleiner als bei der unbeeinflussten Zelle.

Das Membranpotential sank während der Applikation der Sinusreize um etwa 3 mV (Abb. 29b). Dies ist durch das Absinken der oberen Grenze der Amplitudenschwingung er-

klärbar, die durch die Höhe des Off-Transients gegeben ist. Aufgrund des blockierten Off-Transients befindet sich die obere Grenze nun unterhalb des Ruhemembranpotentials (Vergleiche Abb. 28 inset c). Die Folge davon ist ein Absinken des Membranpotentials.

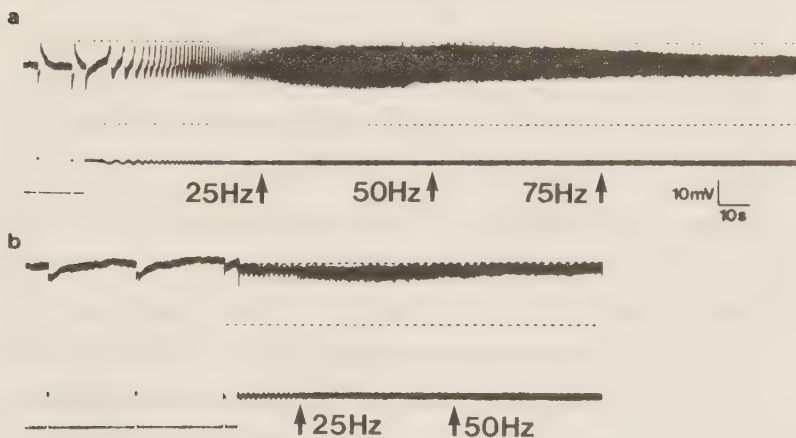


Abb 29: Zeitlicher Verlauf des Potentials auf Darbietung von sinusförmigen Lichtimpulsen von a. einer unbeeinflussten Zelle und b. derselben, allerdings durch Decamethonium beeinflussten, Zelle, deren Off-Transient völlig geblockt ist; die gestrichelten Linien geben jeweils die Höhe des On- und Off-Transients bei Reizung mit rechteckförmigen Lichtimpulsen an; jeweils obere Spur: lichtinduziertes PSP; die Spannungskalibrierung gilt jeweils nur für die obere Spur; jeweils untere Spur: Lichtreiz; die ersten zwei bzw. drei Potentialänderungen sind die Antworten auf einen Rechtecklichtreiz, anschließend wird ein Dauerlicht dargeboten, der Motor für die drehbare Polarisationsfolie eingeschaltet und die Frequenz gleichmäßig hochgefahren; die Zahlen neben den Pfeilen geben die Frequenz der Sinusreize zum jeweiligen Zeitpunkt an; log rel Int = -1,5;

Aus den Ergebnissen dieser Versuche wird deutlich, daß das Fehlen des depolarisierenden Off-Transients eine deutliche Verringerung des hohen zeitlichen Auflösungsvermögens der Monopolaren bei hohen Lichtintensitäten zur Folge hat.

3.4.2. Blockierung des On-Transienten

Keiner der untersuchten Neurotransmitterantagonisten war in der Lage, den On-Transienten selektiv zu blockieren und den Off-Transienten dabei unbeeinflusst zu lassen (Hardie 1987,1988; Straka & Zettler 1988).

Durch frühere Untersuchungen ist jedoch bekannt, daß der hyperpolarisierende On-Transient durch eine Leitfähigkeitserhöhung für Cl^- -Ionen und einem Cl^- -Ioneneinstrom hervorgerufen wird (Zettler & Straka 1987).

Dieser lichtinduzierte Cl^- -Ioneneinstrom macht einen auswärtsgerichteten Cl^- -Ionen-transport notwendig. Durch die pharmakologischen Substanzen Furosemid, SITS und DIDS kann ein transmembraner Transport von Cl^- -Ionen sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten blockiert werden (Cardinal & Green 1973; Candia 1973; Cousin & Motais 1976; Deisz & Lux 1982; Russell 1984; Evans et al 1986).

Die Applikation dieser Substanzen rief jedoch in keinem Fall ein eindeutiges Ergebnis hervor. In den meisten Fällen blieb das lichtinduzierte PSP nach der Applikation der Substanzen völlig unverändert, während in einzelnen Fällen sowohl der On- als auch der Off-Transient geringfügig verkleinert wurden.

Auch die Injektion von Cl^- -Ionen in die monophasischen Zellen, die eine selektive Reduktion des On-Transienten nach sich zieht, war nicht geeignet, um eine länger anhaltende Blockierung zu erzeugen, da die Wirkung nach

Ende der Injektion zu schnell verschwand (Zettler & Straka 1987).

Um dennoch eine selektive Reduktion des On-Transienten zu erreichen, wurde auf eine andere Methode zurückgegriffen. Durch Applikation eines negativen Stroms wird das Membranpotential der L-Neurone hyperpolarisiert. Durch die geringere Potentialdifferenz zwischen Ruhemembranpotential und Umkehrpotential des On-Transienten, welches unterhalb des Ruhemembranpotentials liegt, erfolgt eine Reduktion der Amplitude des On-Transienten (Shaw 1968; Laughlin 1974b; Wilson 1978; Simmons 1982; Guy & Srinivasan 1988). Bei intrazellulären Ableitungen und gleichzeitiger Strominjektion über dieselbe Elektrode ist bei Ableitungen in der Lamina diese Reduktion des On-Transienten nur selten mit einer Verstärkung des Off-Transienten verbunden (Guy & Srinivasan 1988), dessen Umkehrpotential über dem Ruhemembranpotential liegt. Dadurch ist es möglich, den On-Transienten selektiv zu reduzieren.

Für die Strominjektion wurden wegen des geringeren Widerstandes Elektroden verwendet, die mit 2M KCl-Lösung gefüllt waren. Die Reduktion des On-Transienten bei Injektion eines negativen Stroms ist somit allerdings nicht nur auf die hyperpolarisierende Wirkung des negativen Stroms, sondern auch auf die damit verbundene Injektion von Cl⁻-Ionen in die Zelle zurückzuführen.

Für die Versuche wurden nur solche Zellen verwendet, bei denen die Änderung der Amplitude des Off-Transienten

weniger als 2mV betrug.

Nach Anlegen eines negativen Stroms mit jeweils verschiedenen hoher Stromstärke wurden den monopolaren Zellen sinusförmige Lichtreize dargeboten. Die Reduktion des On-Transienten und die Konstanz des Off-Transienten wurden jeweils vor und nach der Stimulation mit Sinusreizen kontrolliert. Für die Bestimmung des zeitlichen Auflösungsvermögens war die Reihenfolge der verschiedenen hohen Strompulse, mit denen die Membran vorpolarisiert wurde, gleichgültig.

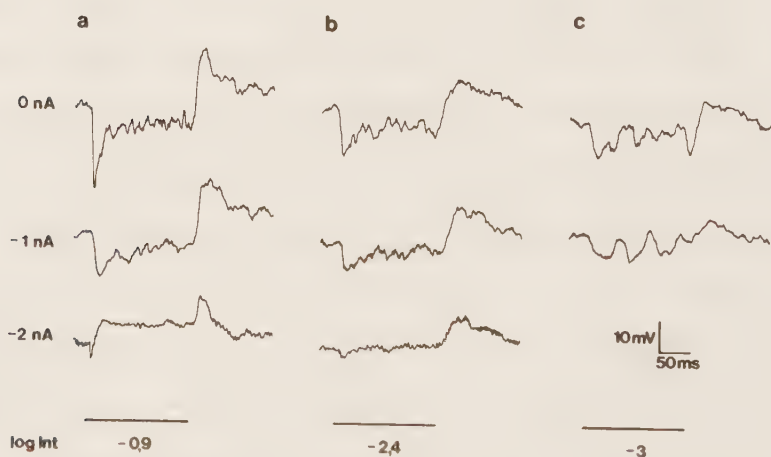


Abb 30: Durch rechteckförmige Lichtreize ausgelöste PSPs einer monopolaren Zelle bei drei verschiedenen Lichtintensitäten a, b, c, und zwei bzw. drei verschiedenen Membranpotentialen, die durch verschieden hohe Strompulse induziert wurden; Höhe der Strompulse ist links neben den PSPs angegeben; die Hyperpolarisierung des Membranpotentials wird durch die Verkleinerung des On-Transienten sichtbar; die Absoluthöhe des Membranpotentials kann jedoch nicht angegeben werden; Unterste Spur: Länge und Intensität der Lichtreize;

Abb. 30 zeigt die, durch rechteckförmige Lichtreize induzierten Potentiale einer monophasischen Zelle bei drei verschiedenen Lichtintensitäten und zwei bzw. drei verschiedenen Stromstärken, mit denen die Zellmembran vorpolarisiert wurde.

Während der On-Transient durch die negativen Strompulse jeweils verschieden stark reduziert wird, bleibt der Off-Transient nahezu unverändert.

Bietet man jeweils während der Hyperpolarisation sinusförmige Lichtreize dar, so läßt sich erkennen, daß die Amplitudenhöhe der sinusförmigen Antworten bei gleicher Frequenz mit zunehmender Höhe der Vorpolarisation der Zelle und damit zunehmender Reduktion des On-Transienten abnimmt (Abb. 31).

Die Schwingungen der Antwortamplituden auf die Sinusreize bei einem vorpolarisierten Membranpotential bewegten sich auch hier wieder zwischen einem depolarisierten Wert und einem hyperpolarisierten Wert. Der depolarisierte Wert entspricht nahezu der Amplitude des Off-Transienten bei rechteckförmigen Lichtreizen. Ähnlich wie bei normalen Zellen war bei geringeren Reduktionsgraden des On-Transienten der hyperpolarisierende Anteil der Sinusantwort ebenfalls kleiner als die Amplitude des On-Transienten bei rechteckförmigen Lichtreizen. Erst bei hohen Reduktionsgraden des On-Transienten erreicht der hyperpolarisierte Wert dessen Amplitudenhöhe (Abb. 32).

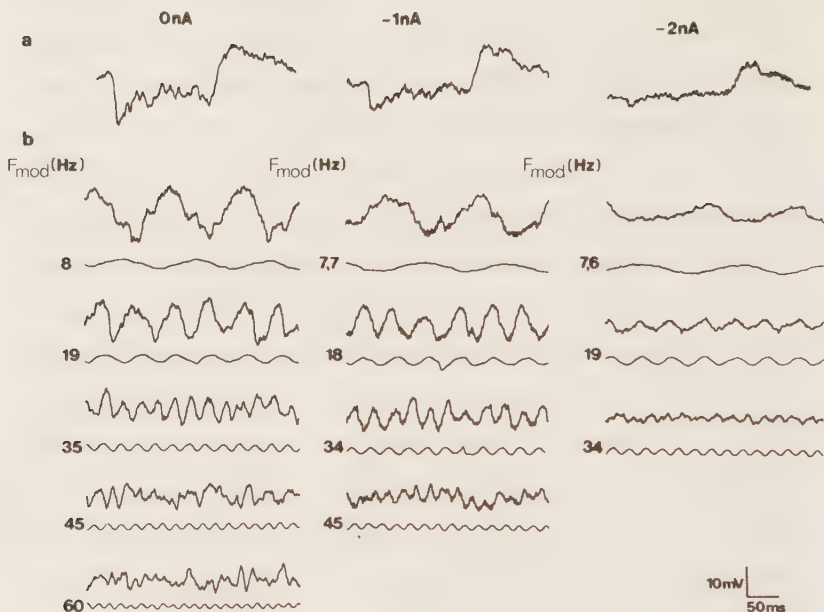


Abb 31: Lichtinduzierte PSPs einer monopolaren Zelle bei drei verschiedenen hohen Reduktionsgraden des On-Transients; Höhe der Strompulse ist angegeben; **a.** durch rechteckförmige Lichtreize induzierte PSPs; **b.** durch sinusförmige Lichtreize induzierte PSPs; die untere Spur ist jeweils der Lichtreiz; Frequenz der Sinusreize ist jeweils links neben dem Lichtreiz angegeben; log rel Int = -2,4;

Trägt man nun wieder die Antwortamplituden bei Sinusreizung gegen die Frequenz der Sinusreize auf, so wird deutlich, daß mit zunehmend negativer Vorpolarisation des Membranpotentials und damit reduziertem On-Transients zum einen die Amplitudenhöhe abnimmt und zum anderen auch das zeitliche Auflösungsvermögen geringer wird (Abb. 33). Das heißt, der -3dB Frequenzwert wird mit zunehmender Reduktion des On-Transients kleiner.

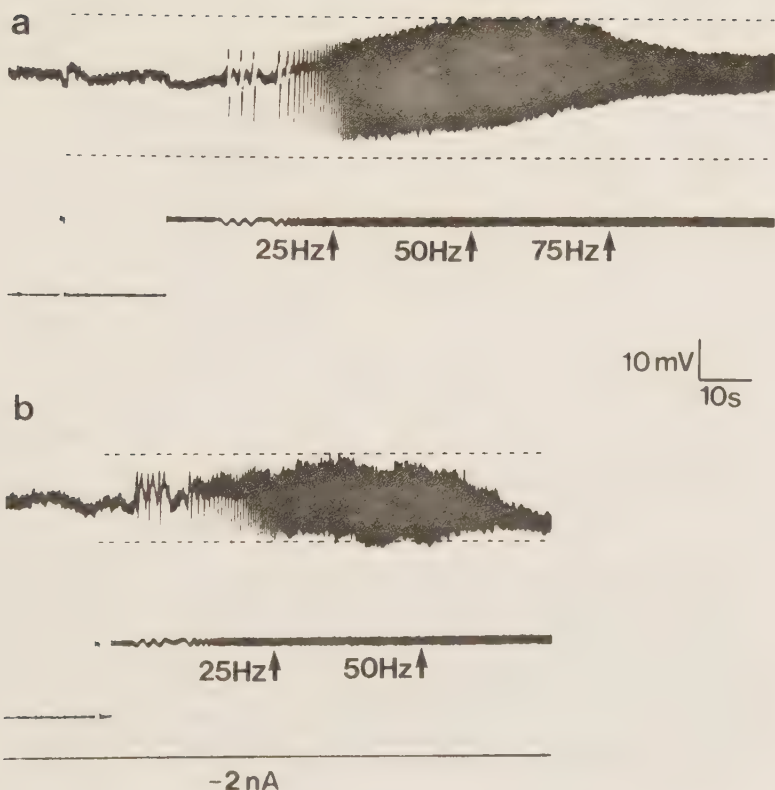


Abb 32: Zeitlicher Verlauf der Applikation von sinusförmigen Lichtimpulsen: **a.** Zelle mit normalem Potential. **b.** dieselbe Zelle, allerdings mit negativ vorpolarisiertem Membranpotential und dadurch reduziertem On-Transienten; die Höhe des Strompulses ist angegeben; die gestrichelten Linien geben jeweils die Höhe des On- und Off-Transienten bei Reizung mit rechteckförmigen Lichtimpulsen an; jeweils obere Spur: lichtinduziertes PSP; die Spannungskalibrierung gilt jeweils nur für die obere Spur; jeweils untere Spur: Lichtreiz; die erste Potentialänderung ist die Antwort auf einen Rechtecklichtreiz, anschließend wird ein Dauerlicht dargeboten, der Motor für die drehbare Polarisationsfolie eingeschalten und die Frequenz gleichmäßig hochgefahren; die Zahlen neben den Pfeilen geben die Frequenz der Sinusreize zum jeweiligen Zeitpunkt an; log rel Int = -1,5;

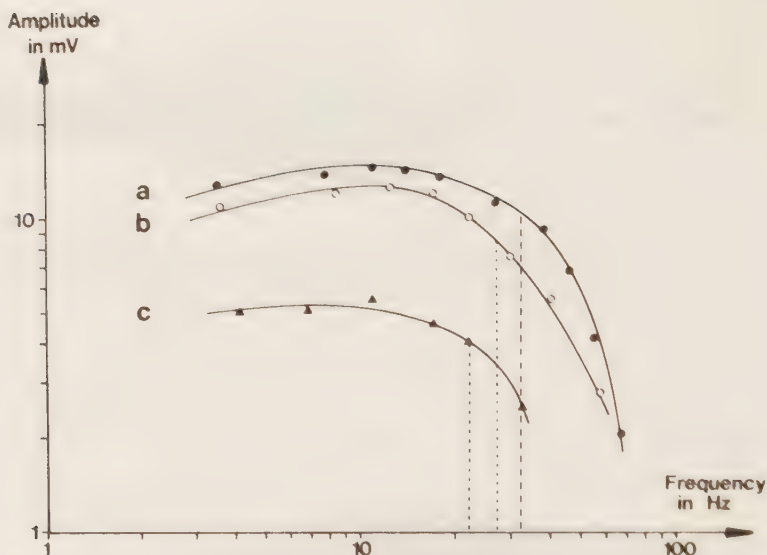


Abb 33: Abhängigkeit des Logarithmus der Peak-zu-Peak Antwortamplitude, bei Reizung einer monopolaren Zelle mit sinusförmigem Lichtimpuls, vom Logarithmus der Frequenz der Sinusreize; jeder Meßwert ist der Mittelwert von 10 Antwortamplituden bei der jeweiligen Frequenz; die gestrichelten Linien geben jeweils den -3dB Wert (70% der Maximalamplitude) als Kenngröße für das zeitliche Auflösungsvermögen an; a. ohne Vorpolarisation des Membranpotentials; b. während Vorpolarisation der Membran mit -1nA; c. während Vorpolarisation der Membran mit -2nA; $\log \text{rel Int} = -2,4$;

Bei den meisten Zellen konnte der On-Transient durch den hyperpolarisierenden Strom nicht völlig reduziert werden. Um dennoch das zeitliche Auflösungsvermögen bei völlig reduziertem On-Transienten zu erhalten, wurde eine Extrapolation über die -3dB Werte bei geringeren Reduktionsgraden des On-Transienten hinaus vorgenommen. Abb. 34 zeigt eine solche Extrapolation. Für die Extrapolationsgerade wurden jedesmal 3 bis 4 Meßpunkte verwendet. Abb 34b stellt die Extrapolationsgerade mit den Werten aus

Abb. 33 dar. Der -3dB Frequenzwert beträgt hier demnach bei einem völlig reduzierten On-Transienten und einer relativen Lichtintensität von -2,4 etwa 21 Hz.

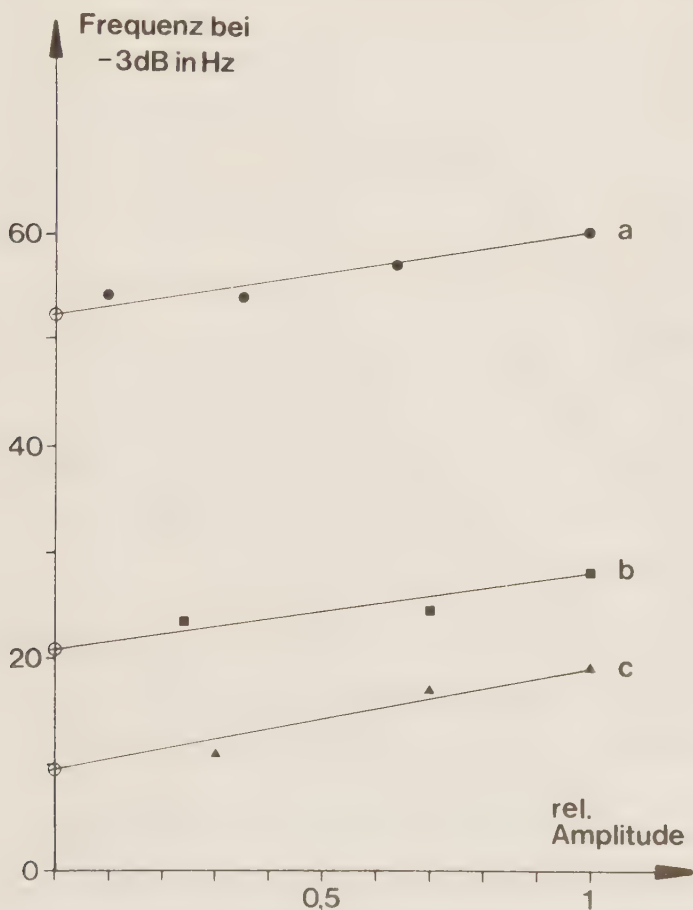


Abb. 34: Abhängigkeit der Modulationsfrequenz bei -3dB von der Amplitude des On-Transienten bei drei verschiedenen Lichtintensitäten und verschieden hohem negativ vorpolarisiertem Membranpotential; die Amplitude ist auf die Höhe des On-Transienten bei unbeeinflusstem Membranpotential hin relativiert; der Schnittpunkt der Extrapolationsgeraden mit der Ordinate gibt den theoretischen Wert des zeitlichen Auflösungsvermögens bei völlig reduziertem On-Transient an; log rel Int = -3,4 (a); -2,4 (b); -0,9 (c);

Trägt man bei Zellen, deren On-Transient geblockt ist, die Modulationsfrequenz bei -3dB wieder gegen die Lichtintensität auf, so erhält man eine F-Int Kennlinie (Abb. 35, Kurve b), die sich sowohl von der der normalen Zellen (Abb. 35, Kurve c) als auch von der der Zellen mit geblocktem Off-Transienten unterscheidet (Abb. 35, Kurve a). Die F-Int Kennlinie der Zellen mit geblocktem On-Transienten (Abb. 35, Kurve b) hat zwar eine ähnliche Steigung wie die der normalen Zellen (Abb. 35, Kurve c), ist allerdings etwa um 30-40 Hz nach unten verschoben.

Vergleicht man nun die Kennlinie des zeitlichen Auflösungsvermögens von Zellen, deren depolarisierende Potentialkomponente (Off-Transient) geblockt ist, mit der von Zellen, deren hyperpolarisierende Potentialkomponente (On-Transient) geblockt ist, so sieht man deutlich, daß bei Fehlen des depolarisierenden Anteils keine Steigerung des zeitlichen Auflösungsvermögens bei höheren Lichtintensitäten stattfindet. Bei Fehlen des hyperpolarisierenden Anteils ist dagegen sehr wohl eine Steigerung vorhanden, allerdings ist die F-Int Kennlinie sehr weit nach unten verschoben.

Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß der depolarisierende Anteil des lichtinduzierten Potentials der Monopolaren für die Steigerung des zeitlichen Auflösungsvermögens bei steigenden Lichtintensitäten verantwortlich ist, während der hyperpolarisierende Anteil des Potentials das Grundniveau liefert, das sich auch mit steigender Lichtintensität nicht erhöht.

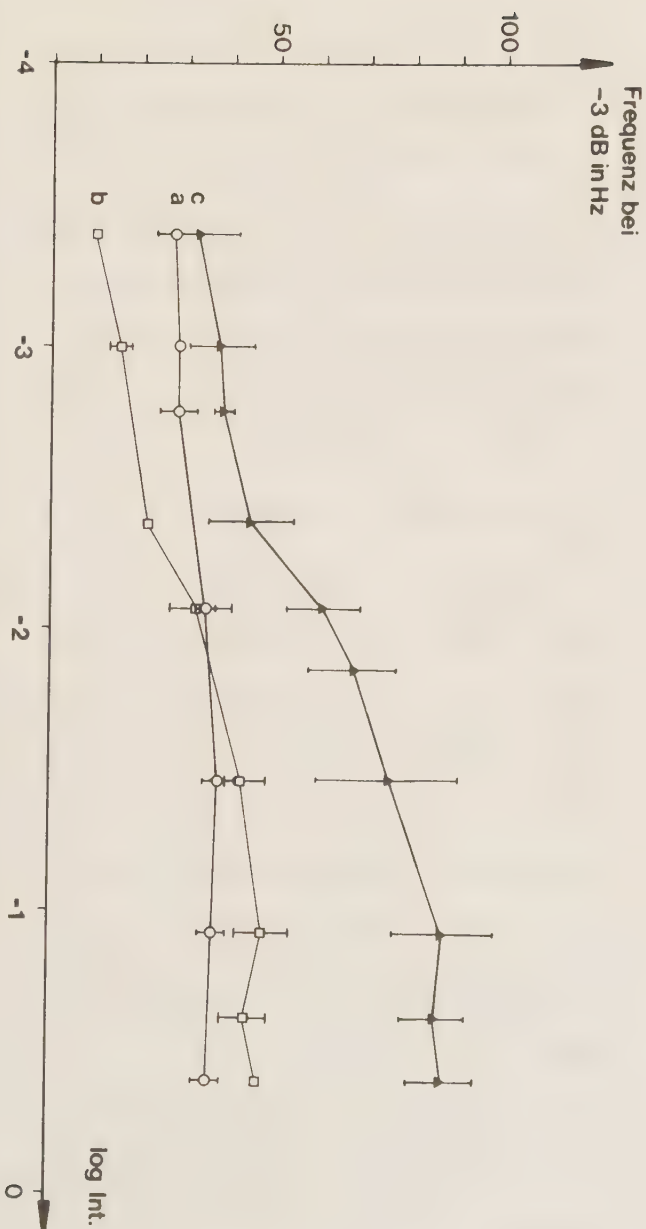


Abb 35: Zeitliches Auflösungsvermögen dargestellt als Abhängigkeit der Frequenz bei -3 dB von der Lichtintensität bei a. Zellen mit geblocktem Off-Transienten (n= jeweils 3), b. Zellen mit geblocktem On-Transienten (n= jeweils 3), c. unbeeinflussten Zellen (n= jeweils 5); dargestellt sind auch die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte;

4. DISKUSSION

4.1. Pharmakologie der monopolaren Zellen und mögliche funktionelle Bedeutung der beteiligten Transmitter

Aufgrund der pharmakologischen Versuche dieser und anderer Arbeiten und der bereits bekannten immunocytochemischen und morphologischen Daten aus der Literatur können mehrere Aussagen über das Verschaltungsschema im peripheren visuellen System von Insekten gemacht werden.

4.1.1. On-Transient: Histamin

Die Ergebnisse der Applikation von Histaminblockern decken sich nahezu vollständig mit denen, die Hardie (1988) beschrieben hat. Die als spezifisch geltenden H₂-Blocker Ranitidin, Metiamid und Cimetidin (Schwartz et al 1986; Arrang et al 1987) zeigen bei iontophoretischer Applikation schon bei sehr geringen Ladungsmengen eine antagonistische Wirkung auf das lichtinduzierte PSP der Monopolaren. Dagegen bleiben spezifische H₁-Blocker (Promethazin) ohne Wirkung. Dies läßt darauf schließen, daß der Histaminrezeptor eher dem H₂-Typ als dem H₁-Typ ähnelt.

Auch die durch iontophoretisch appliziertes Histamin ausgelösten hyperpolarisierenden Potentiale lassen sich mittels der oben genannten Antagonisten vollständig blockieren.

Neben der hyperpolarisierenden Wirkung von exogen appliziertem Histamin auf das Potential der Monopolaren im Komplexauge von *Calliphora* und *Musca* (Hardie 1987,1988) konnte eine solche auch bei den L-Neuronen im Ocellus von *Locusta* beobachtet werden (Simmons & Hardie 1988; Schlemermeyer et al 1989). Das histamininduzierte Potential blieb trotz Applikation von Co^{2+} -Ionen erhalten, woraus auf eine direkte Wirkung von Histamin geschlossen werden kann (Hardie 1987). Dieses hyperpolarisierende Potential ähnelt dem On-Transienten der Lichtantwort in Zeitverlauf und Amplitude (Hardie 1987).

Zusammen mit den Ergebnissen mehrerer neuerer immunocytochemischer Arbeiten, in denen nachgewiesen wurde, daß die Photorezeptoren im Komplexauge und Ocellus von *Calliphora* und *Musca* (Nässel et al 1988) und die ocellären Photorezeptoren von *Locusta* Histamin enthalten (Schlemermeyer et al 1989), läßt sich damit mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, daß diese Photorezeptoren Histamin als Transmitter verwenden.

Im Komplexauge von *Calliphora* sind dies die Photorezeptoren R1-6 und R8.

Aufgrund der Tatsache, daß die depolarisierende ebenso wie die hyperpolarisierende Potentialkomponente des lichtinduzierten monopolaren Potentials bei Applikation der Histaminantagonisten blockiert wird, kann man schließen, daß an der Vermittlung der Information für den Off-Transienten ebenfalls Histamin beteiligt ist. Allerdings kann durch iontophoretisch appliziertes Histamin in

derselben oder der Nachbarcartridge nur eine Hyperpolarisation hervorgerufen werden (Hardie 1987).

Diese Hyperpolarisation ist wie der On-Transient der Lichtantwort von einer Abnahme des Membranwiderstandes begleitet, die durch ein Öffnen von Ionenkanälen hervorgerufen wird (Laughlin 1974b; Hardie 1987; Zettler & Straka 1987; Guy & Srinivasan 1988).

Aufgrund der Injektion von Cl^- -Ionen und der dadurch bedingten Reduktion des On-Transienten wurde gezeigt, daß die Hyperpolarisation des lichtinduzierten monophasischen PSPs durch ein Öffnen von Cl^- -Ionenkanälen ausgelöst wird (Zettler & Straka 1987). Das Öffnen dieser Kanäle dürfte auch für die histamininduzierte Hyperpolarisation verantwortlich sein (Hardie 1987).

4.1.2. Off-Transient

In keinem Fall wurde jedoch eine Depolarisation in Zusammenhang mit der Applikation von Histamin sichtbar. Das heißt, von den Photorezeptoren ausgeschüttetes Histamin genauso wie iontophoretisch appliziertes Histamin induziert lediglich eine Hyperpolarisation, deren Grundlage ein Öffnen von Cl^- -Ionenkanälen sein dürfte. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß der depolarisierende Off-Transient nicht direkt von den Photorezeptoren auf Monophasische, sondern über weitere Zellen verschaltet wird und über einen anderen Kanal induziert wird.

Dies lassen auch die Ergebnisse der Applikation von

Acetylcholin und GABA vermuten. Beide Transmitter induzieren ein depolarisierendes Potential bei den Monopolaren, dessen Amplitudenhöhe der des lichtinduzierten Off-Transients vergleichbar ist. Allerdings ist noch unklar, ob die Wirkung direkt oder indirekt ist, wenngleich Hardie (1987) für GABA aufgrund eines einzigen GABA-versuchs eine direkte Wirkung postulierte.

Unterschiede zwischen den Potentialantworten auf Acetylcholin und GABA sind zum einen der längere Zeitverlauf des GABAinduzierten Potentials und zum anderen die geringere Amplitude dieser Potentiale (Abb. 13 und 21).

Dies läßt darauf schließen, daß die depolarisierenden Potentiale entweder durch zwei unterschiedliche Eingänge generiert werden oder, daß die Wirkung von Acetylcholin indirekt ist und über GABA auf die monopolaren Zellen vermittelt wird.

Die acetylcholininduzierten Depolarisationen erreichen dabei Amplituden, die auch beim Off-Transienten des lichtinduzierten PSPs generiert werden, während die Maximalamplituden der GABAinduzierten Depolarisationen nur etwa 6mV betragen. Betrachtet man das PSP von monopolaren Zellen genauer, so fällt auf, daß der Off-Transient bei vielen Zellen mehr oder weniger aus zwei Potentialkomponenten besteht, einer schnelleren und einer langsameren (Zettler & Järvilehto 1973). Dies wäre mit zwei verschiedenen Eingängen für den Off-Transienten erklärbar. Auch die große Variabilität im Zeitverlauf könnte darin ihre Begründung finden.

Lichtinduzierte Potentiale während der durch GABA bzw. Acetylcholin ausgelösten Depolarisation zeigen sowohl reduzierte Off- als auch On-Transienten. Während der GABA-Antwort konnte eine Erniedrigung des Membranwiderstandes festgetellt werden, die durch ein Öffnen von Ionenkanälen hervorgerufen wird (Hardie 1987). Die Reduktion des Off-Transienten liegt vermutlich darin, daß die Kanäle des Off-Transienten bereits durch das exogene GABA bzw. Acetylcholin geöffnet worden sind und die Off-Antwort der Zelle nurmehr eine geringe Potentialänderung zur Folge hat. Dies wurde auch schon für den On-Transienten während der Histaminapplikation beobachtet (Hardie 1987).

Durch den Widerstandsabfall während der Antworten auf GABA- bzw. Acetylcholinpulse wird auch der On-Transient kleiner. Der Grund dafür mag in dem kleineren Membranwiderstand liegen, der einen geringeren Spannungsabfall bei Öffnung der On-Kanäle zur Folge hat.

4.1.2.1. Off-Transient: Acetylcholin

Die Ergebnisse der Applikation von GABA- bzw. Acetylcholinantagonisten unterstützen ebenfalls die Hypothese einer gabaergen und/oder acetylcholinergen Induzierung des Off-Transienten.

Sowohl Deca- als auch Hexamethonium gelten als wirksame Antagonisten der cholinergen Übertragung (Colquhoun & Rang 1976; Wang et al 1978; Ascher et al 1978; David &

Satelle 1984; Bonaventure et al 1987; Satelle 1988).

Beide Substanzen sind in der Lage, den Off-Transienten der monophasischen Lichtantwort selektiv zu blockieren. Erst bei einer 10-100-fachen Ladungsmenge wie sie zur vollständigen Blockierung des Off-Transienten notwendig war wurde eine langsame Reduktion des On-Transienten sichtbar. Widerstandsmessungen während des blockierten Off-Transienten durch Applikation von Hexamethonium ergaben eine Erniedrigung des Membranwiderstandes während des blockierten Off-Transienten, die anschließend langsam zum Ruhemembranwiderstand zurückkehrte (Hardie 1988). Aus diesen Messungen folgert er eine Bindung von Hexamethonium an die Ionenkanäle, die den On-Transienten generieren, und eine Verlängerung der Öffnungszeiten dieser Kanäle. Durch den geringen Membranwiderstand während dem Licht-Aus kann der Eingang für den Off-Transienten keinen Spannungsabfall erzeugen.

Andere Arbeiten lassen ebenfalls den Schluß zu, daß sowohl Deca- als auch Hexamethonium eine eher unspezifische antagonistische Wirkweise besitzen. So wird die Wirkung von Hexamethonium an Aplysianeuronen (Ascher et al 1978, 1979) auf dem Level der Ionenkanäle vermutet, da die Blockierung der Übertragung spannungsabhängig ist. Auch Decamethonium scheint beim Endplattenpotential am Froschmuskel seine Wirkung direkt auf die Kanäle auszuüben (Adams & Sakman 1978).

Andere Arbeiten dagegen diagnostizieren für diese beiden cholinergen Antagonisten eine spannungsunabhängige Wir-

kung, was wiederum eine Bindung an den Acetylcholinrezeptor impliziert (David & Satelle 1984; Bonaventure et al 1987).

Deca- und Hexamethonium scheinen demnach sowohl an den Acetylcholinrezeptor als auch an Ionophoren binden zu können, um ihre antagonistische Wirkung auszuüben. Zusammen mit der Tatsache, daß Acetylcholin eine depolarisierende Wirkung besitzt, muß auch die Möglichkeit eines acetylcholinergen Inputs zur Erzeugung des Off-Transients diskutiert werden.

Dabei bindet Deca- bzw. Hexamethonium zum einen an den Acetylcholinrezeptor und blockiert den Off-Transienten und zum anderen an die durch Histamin gesteuerte Ionophore und verlängert deren Kanalöffnungszeit. Auch in diesem Fall erhält man eine Widerstandserniedrigung während des blockierten Off-Transients, wobei die Bindung an die Ionophore die Bindung an den Rezeptor überdeckt.

Die cholinergen Antagonisten Curare und Atropin blockieren das lichtinduzierte PSP der monophasischen Zellen ähnlich wie die Histaminantagonisten Ranitidin und Metiamid vollständig, wobei On- und Off-Transient gleichzeitig reduziert werden.

Beide Substanzen wirken schon in sehr geringen Konzentrationen auf die nikotinische bzw. muscarinische cholinerge Übertragung (Gilbert et al 1979; Wang et al 1978; Prives 1980; Breer 1981; David & Satelle 1984; Satelle 1985). Für beide Substanzen konnte allerdings eine spannungsabhängige Wirkung am D₁ Motoneuron von *Periplaneta* und

damit eine Bindung an die von Acetylcholin gesteuerten Ionenkanäle nachgewiesen werden (David & Satelle 1984). Auch am Froschmuskel konnte gezeigt werden, daß Curare als ein 'open channel' Blocker der durch Acetylcholin aktivierten Kanäle wirkt (Colquhoun et al 1979). Im Nervensystem vom Hummer konnte Curare sogar die Histanantworten blockieren (Clairborne & Selverston 1984). Daher ist die relativ unspezifische Wirkung von Curare und Atropin nicht verwunderlich. Durch die Möglichkeit, daß beide Substanzen an den Ionophoren und nicht an den Transmitterbindungsstellen wirken, könnten sie auch die von anderen Transmittern aktivierten Kanäle blockieren. Bei der Bindung an die histaminaktivierten Kanäle wird somit das lichtinduzierte PSP vollständig reduziert. Eine Wirkung auf einen acetylcholinergen Input könnte auch in diesem Fall wieder überdeckt werden.

Die Ergebnisse der Acetylcholinapplikation und die selektive Blockierung des Off-Transienten durch die acetylcholinergen Antagonisten Deca- und Hexamethonium deuten auf einen cholinergen 'Off-Input' hin.

Eine weitere Evidenz für eine Beteiligung von Acetylcholin kommt von *Drosophila* Mutanten, denen das Gen für das Acetylcholin synthetisierende Enzym Acetylcholintransferase fehlt. Ableitungen des ERGs dieser Fliegen zeigen keinen Off-Transienten mehr (Greenspan 1980). Der Off-Transient des ERGs stammt nachweislich vom Off-Transienten der monophasischen Zellen (Coombe 1986). Durch das Fehlen des synthetisierenden Enzyms für Acetylcholin ist

eine cholinerge synaptische Übertragung nicht möglich. Bei einem acetylcholinergen Input des Off-Transienten kann folglich auch der Off-Transient nicht generiert werden.

Durch immuncytochemische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die amakrinen Zellen die einzigen acetylcholinergen Zellen in der Lamina von *Calliphora* sind (Datum et al 1989). Diese Zellen sind präsynaptisch zu den L4-Zellen, die wiederum präsynaptisch zu den monopolaren Zellen L1-L2 sind (Strausfeld 1984). Über den Transmitter der L4-Neurone ist allerdings noch nichts bekannt. Dies wäre jedoch ein möglicher Weg für den cholinergen Input, wobei die amakrinen Zellen ihren Input von den Photorezeptoren R1-6 aus den Nachbarcartridges bekommen (Strausfeld 1984). Über diesen Verschaltungsweg wäre die Information für den Off-Transienten auch durch Substanzen, die die histaminerge Übertragung blockieren, beeinflusbar. Dies wird durch die Applikation der histaminergen Antagonisten auch sichtbar, da sowohl der On- als auch der Off-Transient blockiert wird.

4.1.2.2. Off-Transient: GABA

Ähnlich wie Deca- und Hexamethonium können auch die GABA Blocker Bicucullin und Picrotoxin den Off-Transienten des lichtinduzierten Potentials von monopolaren Zellen selektiv blockieren.

Auch die I-Zellen der Entenmuschel, die zu den Photo-

rezeptoren postsynaptisch und den monopolaren Zellen von Dipteren vergleichbar sind, zeigen bei Applikation von Pikrotoxin eine Reduktion der Off-Amplitude (Timpe & Stuart 1984). Bei Badapplikation von Pikrotoxin und Bicucullin konnte bei den L-Neuronen im Ocellus von Libellen eine Reduktion der Amplitude des Off-Transienten der Lichtantwort beobachtet werden (Klingman & Chappell 1978). Ebenso war bei einer Badapplikation von Pikrotoxin bei den monopolaren Zellen im Komplexauge von *Calliphora* eine Blockierung des lichtinduzierten Off-Transienten die Folge (Datum 1987).

Im Gegensatz zu den GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren bei Vertebraten ist bei den Invertebraten nur ein Typ bekannt, der sich von denen der Vertebraten unterscheidet. Allerdings scheint dieser GABA-Rezeptor sich auch hier in mehrere Untergruppen aufzugliedern (Simmonds 1983; Bormann 1988).

Pikrotoxin wurde in mehreren Arbeiten als nichtkompetitiver GABA-Blocker bei Invertebraten beschrieben, der in seiner Wirkung sehr effektiv ist (Simmonds 1983; Shimahara et al 1987; Lees et al 1987; Eldefrawi & Eldefrawi 1987; Bormann 1988). Dahingegen erfolgt eine Wirkung von Bicucullin auf die GABAerge Übertragung bei Invertebraten meist erst bei sehr hohen Konzentrationen (Earl & Large 1974; Nistri & Constanti 1979; Chalmers et al 1985). An Bindungsstudien im Nervengewebe von Insekten konnte gezeigt werden, daß Bicucullin kaum oder gar nicht in der Lage war, rezeptorgebundenes GABA bzw. Muscimol zu

verdrängen (Breer & Heiligenberg 1985; Lunt et al 1985). In anderen Präparaten, wie am 'stretch receptor' Neuron von Krebsen, hatte Bicucullin dagegen eine sehr potente Wirkung auf die GABAerge Übertragung (Mc Lennan 1970,1973).

Ebenso wie in den L-Neuronen im Ocellus von Libellen (Klingman & Chappell 1978) konnte sowohl Pikrotoxin als auch Bicucullin den Off-Transienten selektiv blockieren. Zusammen mit der Tatsache, daß GABA eine depolarisierende Wirkung auf das Potential der monopolaren Zellen hat, macht dies eine Beteiligung von GABA an der Generierung des Off-Transienten wahrscheinlich.

Eine mögliche Grundlage für den GABAergen Input wären die efferenten C2-Zellen, die durch immunocytochemische Untersuchungen als GABAerg nachgewiesen wurden (Datum et al 1986; Meyer et al 1986) und präsynaptisch zu den monopolaren Zellen L1-L2 sind (Strausfeld 1984). Die ebenfalls GABAergen R7-Photorezeptoren (Datum et al 1986) sind dagegen unwahrscheinlich, da sie keine Synapsen in der Lamina haben. Ein Input über die Medulla ist nicht wahrscheinlich, da die R7-Photorezeptoren eine andere spektrale Empfindlichkeit besitzen als die Monopolaren (Zettler & Autrum 1975).

Aufgrund der großen Variabilität des lichtinduzierten Off-Transienten und aufgrund der unterschiedlichen Amplituden und des unterschiedlichen Zeitverhaltens der depolarisierenden GABA- bzw. Acetylcholinantworten ist es nicht unwahrscheinlich, daß der Off-Transient sowohl

durch einen GABA- als auch durch einen Acetylcholininput generiert wird. Andere Verschaltungswege für den Off-Transienten können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

4.2. Charakteristische Merkmale des Off-Transienten

Aus den pharmakologischen Untersuchungen (Hardie 1987, 1988; Strass & Zettler 1988) wurde bereits deutlich, daß der Off-Transient von ein oder zwei vom On-Transienten unabhängigen Eingängen generiert wird und die Information dafür nicht über die Synapse Photorezeptor-Monopolare geliefert wird.

Der Off Transient ist ebenso wie der On-Transient von der Lichtintensität abhängig, weist aber in der Regel geringere Amplituden auf. Außerdem besitzt die U-Int Kennlinie des Off Transienten eine geringere Steigung und keine so ausgeprägte Sättigung bei hohen Lichtintensitäten (Abb. 4).

Bei der Stimulation mit ringförmigen Lichtreizen sieht man, daß On- und Off Transient sich auf diese Reize hin unterschiedlich verhalten (Abb. 8). Dies deutet ebenfalls auf unterschiedliche Eingänge hin. Im Gegensatz zum Punktreiz, bei dem das Zentrum stimuliert wird, erfolgt bei dem Ringreiz eine stärkere Stimulation des Umfeldes. Die Amplituden des On-Transienten sind bei Ringreizen wesentlich kleiner als bei Punktreizen, während dieser Unterschied beim Off Transienten nur sehr gering ist.

Dies läßt vermuten, daß die Information für den Off-Transienten durch Reizung des Umfeldes geliefert wird, während die Information für den On-Transienten vom Zentrum kommt. In diesem Fall müßte der Off-Transient bei Stimulation mit Punktreizen allerdings kleinere Amplituden zeigen als bei Ringreizen. Da bei dieser Stimulationsmethode die Anzahl der gereizten Ommatidien in beiden Reizsituationen relativ hoch ist, wird in beiden Fällen sowohl das Zentrum als auch das Umfeld mitgereizt. Dadurch bleibt es allerdings unklar, inwieweit die Information für den Off-Transienten tatsächlich durch Reizung des Umfeldes geliefert wird.

Ein direkter Hinweis dafür, daß die Information für den Off-Transienten vom Umfeld geliefert wird, kommt aus dem Vergleich zweier verschiedener Stimulationsmethoden mit punktförmigen Lichtreizen.

Bei Einzelstimulation der 6 Photorezeptoren R1-6 einer cartridge mit einem 2ms dauerndem Lichtreiz wurde gezeigt, daß das PSP der monopolaren Zellen keinen Off-Transienten hat (van Hateren 1987). Mit dieser Methode erfolgt nur eine Stimulation des Zentrums.

Dem gegenüber wurde bei einer größerflächigen Reizung des Auges mit etwa der gleichen Lichtintensität und der gleichen Reizdauer ein Off-Transient am Ende des Lichtstimulus sichtbar (Hardie 1987). Die Amplitude des On-Transienten war bei beiden lichtinduzierten Potentialen nahezu gleich groß.

Durch die größerflächige Stimulation wird auch eine

Reizung des Umfeldes bewirkt. Dies unterstützt demnach die Hypothese, daß die Information für den Off-Transienten oder eine Komponente des Off-Transienten durch das Umfeld geliefert wird. Ein möglicher Weg wäre der Input über die amakrinen Zellen und die L4-Neurone auf die monopolaren Zellen L1-L2, wie bei der Pharmakologie schon angedeutet. Da die amakrinen Zellen ihren synaptischen Input über ihre α -Fasern von den Photorezeptoren R1-R6 der benachbarten Cartidges bekommen (Campos-Ortega & Strausfeld 1973), könnte dies den Informationseingang über das Umfeld darstellen. Über die L4-Neurone, die früher schon als Kandidaten für eine laterale Verschaltung im Komplexauge der Fliegen angesehen wurden (Strausfeld & Campos-Ortega 1973), würde die Information auf die monopolaren Zellen L1-L2 des Zentrums weitergegeben.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Latenzzeiten des On- und Off-Transienten geben weitere Hinweise auf einen Verschaltungsweg der Off-Information über mehrere Zellen. Der synaptische Delay zwischen dem On-Transienten der Photorezeptoren und dem der monopolaren Zellen beträgt etwa 1ms. Der gleiche Wert wurde auch schon von Järvilehto und Zettler (1971) dafür erhalten. Bei den monopolaren Zellen von Libellen betrug der synaptische Delay etwa 2ms (Laughlin 1973). Voltage-clamp Experimente ergaben für die On-Komponente von EPSPs eine synaptische Verzögerung von 773 μ s, was in etwa dem charakteristischen synaptischen Delay von 1ms für ligandengesteuerte Kanäle

entspricht (Llinás 1987).

Der synaptische Delay des Off-Transienten der monopolaren Zellen ist etwa 2-3 mal so lang, wie der des On-Transienten. Unter der Annahme, daß die synaptischen Verzögerungen der Potentiale der Neurone, die an der Informationsübertragung des Off-Transienten beteiligt sind, ungefähr gleich lang sind, wird deutlich, daß die Information für den Off-Transienten über mehrere Synapsen läuft. Diese 2-3ms dauernde synaptische Verzögerung stimmt mit der Tatsache überein, daß der mögliche Weg der Off-Information sowohl bei einer Verschaltung über die C2-Neurone als auch bei einer Verschaltung über die amakrinen Zellen und die L4-Neurone eine Zwischenschaltung von mindestens 2 Synapsen notwendig macht.

Eine andere Möglichkeit, die ebenfalls diskutiert werden muß, wäre, daß der depolarisierende Off-Transient in der Medulla generiert wird und sich in antidromer Richtung ausbreitet (Guy & Srinivasan 1988). Dem steht jedoch das Ergebnis des Versuchs von Stone und Chappell (1981) an den L-Neuronen von Libellen gegenüber. Trotz eines durchtrennten Ocellarnerven zeigten die L-Neurone den gleichen Off-Transienten wie die L-Neurone mit nicht durchtrenntem Axon.

Über den oder die Ionenkanäle, die den Off-Transienten generieren, ist bislang so gut wie nichts bekannt. Aus den Widerstandsmessungen während des lichtinduzierten Potentials wird allerdings deutlich, daß der Off-Transient ebenso wie der On-Transient durch ein Öffnen von

Ionenkanälen hervorgerufen wird, da der Membranwiderstand während des off Transienten geringer als im Quiescenz-Flatten Zustand ist (Abb. 10) (Now 1966; Laughlin 1974b; Wilson 1978; Zettler & Strauß 1987; Guy & Striivassen 1988). Aufgrund des Membranpotentials des off Transienten, das über dem Ruhepotenzial liegt (Zettler & Striivassen 1977; Zimmermann 1978; Guy & Striivassen 1988), ist der des I. Membran von Leucost als etwa 50 mV über dem Ruhepotenzial angegeben wird (Wilson 1978). kann der off Transient nur durch ein Öffnen von Na⁺ und/oder Ca²⁺-Ionenkanälen generiert werden (Wilson 1978).

4.1 Zeitliches Auflösungsvermögen der monophasischen Zellen

Monophasische Zellen sind für ihr hohes zeitliches Auflösungsvermögen bekannt (Striivassen & Zettler 1977). Bei der Untersuchung des zeitlichen Auflösungsvermögens von Monophasen wurde jedoch nie bestimmt, welchen Anteil der on und der off Transient (hyperpolarisierende und depolarisierende Potentialkomponenten) davon hat. Zwar kann die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die beiden Membranpotentialsstellen getrennt untersucht werden.

Für die Versuche hier wurde eine Modulation der sinusförmigen Membrane von 40% gewählt, um möglichst natürliche Bedingungen zu schaffen. Beim Flug in der natürlichen Umgebung der Tiere ist das Auge einer Fliege einer 100%igen hell-dunkel Modulation ausgesetzt, von

dern ein Konstantlicht wird durch Hell-Dunkelreize moduliert (zB. Schatten) (Laughlin 1984).

Unbeeinflusste monopolare Zellen zeigen unabhängig von der Höhe der Modulation und der Lichtintensität einen ähnlichen Frequenzgang wie die monopolaren Zellen der Arbeit von Järvilehto und Zettler (1971).

Für unbeeinflusste monopolare Zellen ergibt sich für das zeitliche Auflösungsvermögen eine sigmoide Kennlinie (Abb. 7), die bei der kleinsten verwendeten Lichtintensität ein zeitliches Auflösungsvermögen von etwa 30-40 Hz zeigt. Im Sättigungsbereich ab etwa 10^{-1} relativer Lichtintensität beträgt das zeitliche Auflösungsvermögen 90-100 Hz.

Der Acetylcholinblocker Decamethonium zeigte in den pharmakologischen Versuchen die potenteste Wirkung auf das lichtinduzierte PSP der monopolaren Zellen. Dabei konnte der Off-Transient der Lichtantwort selektiv blockiert werden. Unabhängig von möglichen synaptischen Eingängen des Off-Transienten über andere Transmitter wurde dieser Antagonist für die weiteren Versuche verwendet. Unter dem Einfluß von Decamethonium konnte das zeitliche Auflösungsvermögen von Zellen ohne die depolarisierende Off-Komponente untersucht werden.

Bei geringen Lichtintensitäten ist das zeitliche Auflösungsvermögen von decamethoniumbeeinflussten und -unbeeinflussten Zellen in etwa gleich. Zellen, bei denen die depolarisierende Potentialkomponente vollständig blockiert war, zeigten allerdings ein deutlich verminder-

tes Auflösungsvermögen bei höheren Lichtintensitäten (Abb. 27). Der Anstieg, den unbeeinflusste Zellen im mittleren Intensitätsbereich zeigen, fehlt den Zellen, deren depolarisierende Off-Komponente blockiert wurde. Die Folge ist, daß die F-Int Kennlinie über den gesamten Intensitätsbereich hinweg relativ gering und konstant bleibt (zwischen 30-40 Hz).

Daraus läßt sich schließen, daß die depolarisierende Potentialkomponente für die Steigerung des zeitlichen Auflösungsvermögens bei höheren Lichtintensitäten verantwortlich ist.

Die einzige Methode, mit der es möglich war, den On-Transienten zu reduzieren und den Off-Transienten unbeeinflusst zu lassen, war die der Hyperpolarisierung des Membranpotentials. Das Umkehrpotential des On-Transienten liegt bei etwa -40 mV (Laughlin 1974b; Zettler & Straka 1987). Durch Hyperpolarisation wird das Membranpotential dem Umkehrpotential angenähert und dadurch der On-Transient reduziert bzw. völlig zum Verschwinden gebracht (Shaw 1968; Wilson 1978; Zimmermann 1978; Simmons 1982; Guy & Srinivasan 1988).

Da das Membranpotential durch Injektion von negativem Strom nicht immer bis zum Umkehrpotential hyperpolarisiert werden konnte, mußte in diesen Fällen eine Extrapolation über die geringeren Reduktionsgrade hinaus erfolgen. Um den Fehler dabei so gering wie möglich zu halten, wurde versucht, den On-Transienten möglichst weit zu reduzieren und die Messungen bei mindestens 3-4

Reduktionsgraden des On-Transienten durchzuführen. Durch die Verwendung von KCl-Elektroden für diese Versuche wurden bei Anlegen des hyperpolarisierenden Stroms auch stets Cl^- -Ionen mit in die Zelle injiziert. Aufgrund der Tatsache, daß der On-Transient durch einen Cl^- -Ionen-einstrom entlang des Konzentrationsgefälles hervorgerufen wird (Zettler & Straka 1987), bewirkt die Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Konzentration durch Injektion eines negativen Stroms, zusätzlich zur Verminderung der On-Amplitude durch die Hyperpolarisierung der Membran, ebenfalls eine Reduktion des On-Transienten. Die Generierung eines normalen Off-Transienten wird durch die Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Konzentration nicht verändert (Zettler & Straka 1987). Somit unterstützt dieser Effekt die Reduktion des On-Transienten unter Beibehaltung der Amplitude des Off-Transienten.

Zellen, deren hyperpolarisierende Potentialkomponente (On-Transient) reduziert wurde, besitzen eine F-Int Kennlinie, die einen ähnlichen Anstieg über den Intensitätsbereich hinweg zeigt wie die normalen Zellen (Abb. 35). Allerdings ist diese Kennlinie um etwa 30-40 Hz nach unten verschoben, so daß das Auflösungsvermögen bei der kleinsten Lichtintensität nur etwa 10 Hz beträgt.

Das heißt demnach, daß Zellen ohne die hyperpolarisierende Potentialkomponente der Grundlevel fehlt, während die Steigerung des Auflösungsvermögens zu höheren Lichtintensitäten hin vorhanden ist. Zellen, denen die depolarisierende Potentialkomponente fehlt, besitzen zwar

einen Grundlevel, der allerdings kaum eine weitere Steigerung bei höheren Lichtintensitäten erfährt.

Zusammengefaßt kann also gesagt werden, daß die hyperpolarisierende Potentialkomponente des lichtinduzierten monophasischen PSPs (On-Transient) für den Grundlevel des zeitlichen Auflösungsvermögens verantwortlich ist, während die depolarisierende Potentialkomponente (Off-Transient) eine Steigerung bei höheren Lichtintensitäten verursacht. Diese Eigenschaften werden zum Teil auch schon aus den Kennlinien der lichtinduzierten PSPs deutlich. Der Off-Transient ist bei den Lichtintensitäten, bei denen der On-Transient schon vorhanden ist, noch kaum sichtbar. Erst bei höheren Intensitäten ist er deutlich ausgeprägt. Betrachtet man gleichzeitig die Antworten der Sinusreize sowohl bei den normalen als auch bei den beeinflussten Zellen (Abb. 29,32), so läßt sich erkennen, daß die depolarisierende Komponente der Sinusantworten stets die Amplitude des Off-Transienten erreicht. Die hyperpolarisierende Komponente der Sinusantworten dagegen ist stets kleiner als der On-Transient. Erst bei hohen Reduktionsgraden des On-Transienten erreicht sie dessen Amplitude.

Daraus folgt, daß die Amplitudenhöhe der Sinusantworten und damit auch das zeitliche Auflösungsvermögen über einem Grundlevel durch die Amplitudenhöhe des depolarisierenden Off-Transienten bedingt sind. Dieser Grundlevel wird durch den hyperpolarisierenden On-Transienten angegeben, der bei Fehlen des Off-Transienten (durch Blockie-

rung oder bei niederen Lichtintensitäten) sichtbar wird und etwa 30-40 Hz beträgt.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß der Off-Transient einen wichtigen Stellenwert im lichtinduzierten Potential der monophasischen Zellen einnimmt, da dieser depolarisierende Potentialanteil für das hohe zeitliche Auflösungsvermögen des Fliegenauges, das schon Autrum (1950) anhand des ERGs beschrieben hat, verantwortlich ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß von potentiellen Transmitterkandidaten und deren Antagonisten auf das lichtinduzierte PSP der monopolaren Zellen im Komplexauge von *Calliphora erythrocephala* wurde elektrophysiologisch untersucht.

Für diese Experimente wurden Doppelelektroden mit dem dafür benötigten äußerst geringen Spitzenabstand entwickelt, die mittels eines speziellen Elektrodenziehprogramms hergestellt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Acetylcholinantagonisten Deca- und Hexamethonium den depolarisierenden Off-Transienten der lichtinduzierten Monopolarenantwort selektiv blockieren, während der On-Transient unverändert bleibt. Auch die GABA-Blocker Bicucullin und Pikrotoxin blockieren selektiv den Off-Transienten der Lichtantwort.

Die Applikation von Acetylcholin bzw. GABA hat in beiden Fällen eine depolarisierende Antwort der monopolaren Zellen zur Folge. Allerdings zeigt die durch GABA ausgelöste Depolarisation kleinere Amplituden und einen längeren Zeitverlauf, was auf unterschiedliche Eingänge schließen läßt.

Die Applikation der Histaminantagonisten Ranitidin, Metiamid und Cimetidin hat eine vollständige Blockierung der Lichtantwort der monopolaren Zellen zur Folge. Dabei werden On- und Off-Transient simultan reduziert.

Die gleiche Wirkung kann auch mit den klassischen Acetylcholinblockern Curare und Atropin erreicht werden.

Die Einordnung dieses Effekts ist jedoch schwierig, da die Spezifität dieser beiden Substanzen durch neuere Arbeiten in Frage gestellt wird.

Die selektive Blockierung des Off-Transienten sowohl durch GABA- als auch durch Acetylantagonisten und die depolarisierende Antwort der Monopolaren auf GABA- und Acetylcholinpulse machen es wahrscheinlich, daß der Off-Transient von GABA und/oder Acetylcholin gesteuert wird. Ein möglicher GABA-Input für den Off-Transienten könnte dabei über die GABAergen C2-Zellen (Datum et al 1986; Meyer et al 1986) stattfinden, die zu den L1-L2 Neuronen präsynaptisch sind.

Mögliche Kandidaten für einen cholinergen Off-Input sind die amakrinen Zellen, die als einzige Zellen in der Lamina auf Antikörper gegen Cholin Acetyltransferase reagieren (Datum et al 1989). Sie sind postsynaptisch zu den Photorezeptoren R1-6 und präsynaptisch zu den L4-Neuronen, die wiederum einen synaptischen Eingang für die monopolaren Zellen L1-L2 bilden.

Der Effekt der Histaminantagonisten ist leichter zu interpretieren. Wenn Histamin der Transmitter der Photorezeptoren R1-6 ist (Hardie 1987; Nässel et al 1988), dann blockieren die Antagonisten alle Synapsen, die Photorezeptoren mit anderen Zellen verknüpfen. Es sind damit auch alle indirekten Wirkungswege auf die L1-L2 Neurone unterbunden.

Weitere Hinweise auf die synaptische Verschaltung des On- und Off-Transienten konnten durch den Vergleich der

Lichtantworten auf ringförmige und punktförmige Lichtreize erhalten werden. Dabei zeigt sich, daß die Information für den On-Transienten durch das Zentrum geliefert wird, während die Information für den Off-Input höchstwahrscheinlich vom Umfeld kommt.

Auch dies unterstützt die Hypothese eines Informationsweges für den Off-Transienten über die amakrinen Zellen und die L4-Neurone oder die C2-Neurone.

Ein Vergleich der Latenzzeiten von On- und Off-Transient macht deutlich, daß die synaptische Verzögerung des Off-Transienten etwa 2-3 mal so lang wie die des On-Transienten ist. Unter der Annahme, daß der synaptische Delay aller an der Verschaltung in der Lamina beteiligten Zellen ähnlich ist, kann ebenfalls angenommen werden, daß die Off-Information über mehrere Zellen verschaltet wird. Untersuchungen des Widerstandsverhaltens von monopolaren Zellen während des lichtinduzierten Potentials zeigen, daß während des On- und Off-Transienten eine Erniedrigung des Membranwiderstandes stattfindet. Dies ist auf eine Öffnung von Ionenkanälen zurückzuführen. Aufgrund der Ionenverteilungen kann es sich beim Off-Transienten nur um Na^+ und/oder Ca^{2+} -Ionenkanäle handeln.

Durch die pharmakologischen Ergebnisse war es möglich, das hohe zeitliche Auflösungsvermögen der Monopolaren (Järvilehto & Zettler 1971) weiter aufzuklären. Dabei wurden die hyperpolarisierende und die depolarisierende Potentialkomponente der Lichtantwort getrennt untersucht. Durch die selektive Wirkung von Decamethonium auf den

Off-Transienten ist es möglich, den depolarisierenden Potentialanteil der Lichtantwort vollständig zu blockieren. Eine selektive Reduktion des On-Transienten auf pharmakologischem Weg konnte nicht erreicht werden. Um den On-Transienten dennoch zu reduzieren, wurde das Ruhemembranpotential der Monopolaren durch Injektion von negativem Strom hyperpolarisiert. Durch die geringere Potentialdifferenz des Ruhepotentials zum Umkehrpotential des On-Transienten wird somit die Amplitude des On-Transienten kleiner bzw. am Umkehrpotential völlig reduziert.

Die Dynamik der F-Int Kennlinie (Kennlinie des zeitlichen Auflösungsvermögens) von normalen Monopolaren reicht von etwa 30 Hz bei einer relativen Lichtintensität von 10^{-3} bis zu etwa 90 Hz im Sättigungsbereich bei 10^{-1} .

Monopolare, deren depolarisierender Potentialanteil vollständig blockiert ist, zeigen über den gesamten getesteten Lichtintensitätsbereich keinen weiteren Anstieg der F-Int Kennlinie über den Grundlevel von 30 Hz hinaus.

Zellen, deren hyperpolarisierender Potentialanteil reduziert ist, haben zwar die gleiche Steigerung der F-Int Kennlinie über den Intensitätsbereich hinweg wie normale Monopolare, doch ist die Kennlinie um etwa 30 Hz nach unten verschoben.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die hyperpolarisierende Komponente für den Grundlevel verantwortlich ist, während die depolarisierende Komponente für den Anstieg und das

hohe zeitliche Auflösungsvermögen bei höheren Lichtintensitäten ausschlaggebend ist.

6. LITERATUR

- Abalis IM, Eldefrawi ME and Eldefrawi AT (1983) Biochemical identification of putative GABA/benzodiazepine receptors in house fly thorax muscles. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20:39-48
- Adams PR and Sakmann B (1978) Decamethonium both opens and blocks endplate channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2994-2998
- Akaike N, Hattori K, Oomura Y and Carpenter DO (1985) Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl-conductance by different mechanism. *Experientia* 41:70-71
- Ammermüller J and Weiler R (1985) S-neurons and not L-neurons are the source of GABAergic action in the ocellar retina. *J. comp. Physiol.* 157:779-788
- Arrang JM, Garbarg M and Schwartz JC (1987) Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neurosci.* 23:149-15
- Ascher P, Marty A and Neild TO (1978) The mode of action of antagonists Of the excitatory response to acetylcholine in *Aplysia* neurones. *J. Physiol.* 278:207-235
- Ascher P, Lange W and Rang HP (1979) Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* 295:139-170
- Autrum H (1950) Die Belichtungspotentiale und das Sehen der Insekten (Untersuchungen an *Calliphora* und *Dixippus*). *Z.vergl. Physiol.* 32:176-227
- Autrum H und Hoffmann E (1957) Die Wirkung von Pikrotoxin und Nikotin auf das Retinogramm von Insekten. *Z. Naturforsch.* 12b:752-757
- Autrum H, Zettler F and Järvilehto M (1970) Postsynaptic potentials from a single monopolar neuron of the ganglion opticum I of the blowfly *Calliphora*. *Z. vergl. Physiol.* 70:414-424
- Bonaventure N, Jardon B, Wioland N and Rudlof G (1987) Physiological effects of muscarinic vs nicotinic Ach antagonists upon ganglion cell activity in the frog retina. *Vision Res.* 27:2061-2072
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS* 11:112-116

- Boschek CB (1971) On the fine structure of the peripheral retina and lamina ganglionaris of the fly *Musca domestica*. Z. Zellforsch. 118:369-409
- Braitenberg V (1967) Patterns of projections in the visual system of the fly. I. Retina-lamina projections. Exp. brain Res. 3:271-298
- Braitenberg V and Hauser-Holschuh H (1972) Patterns of projection in the visual system of the fly. II. Quantitative aspects of second order neurons in relation to models of movement perception. Exp. Brain Res. 16:184-209
- Braitenberg V and Debbage P (1974) A regular net of reciprocal synapses in the visual system of the fly, *Musca domestica*. J. comp. Physiol. 90: 25-31
- Breer H (1981) Properties of putative nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in the central nervous system of *Locusta migratoria*. Neurochem. Int. 3:43-52
- Breer H and Heiligenberg H (1985) Neurochemistry of GABAergic activities in the central nervous system of *Locusta migratoria*. J. comp. Physiol. 157:343-35
- Burg M, Stoner L, Cardinal J and Green N (1973) Furosemide effect on isolated perfused tubules. Am. J. Physiol. 225:119-124
- Burkhardt D und Autrum H (1960) Die Belichtungspotentiale einzelner Sehzellen von *Calliphora erythrocephala* Meig. Z. Naturforsch. 15b:612-616
- Burkhardt D and Braitenberg V (1976) Some peculiar synaptic complexes in the first visual ganglion of the fly *Musca domestica*. Cell Tissue Res. 173:287-308
- Callec JJ (1985) Synaptic transmission in the insect central nervous system. In: Kerkut GA and Gilbert LI (eds) Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol 5. Pergamon press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp.139-180
- Campos-Ortega JA and Strausfeld NJ (1972) The columnar organization of the second synaptic region of the visual system of *Musca domestica* L. I. Receptor terminals in the medulla. Z. Zellforsch. 124:561-585
- Campos-Ortega JA and Strausfeld NJ (1973) Synaptic connections of intrinsic cells and basket arborizations in the external plexiform layer of the fly's eye. Brain Res. 59:119-136

- Campos-Ortega JA (1974) Autoradiographic localization of ^3H -gamma-aminobutyric acid uptake in the lamina ganglionaris of *Musca* and *Drosophila*. Z. Zellforsch. 147:415-431
- Candia OA (1973) Short-circuit current related to active transport of chloride in frog cornea: effects of furosemide and ethacrynic acid. Biochim. Biophys. Acta 298:1011-1014
- Chalmers AE, Miller TA and Olsen RW (1985) A pharmacological investigation of invertebrate receptors of 4-aminobutyric acid. Pesticide Sci. 16:435-436
- Chappell RL and Dowling JE (1972) Neural organization of the median ocellus of the dragonfly. J. gen. Physiol. 60:121-147
- Clairborne BJ and Selverston AI (1984) Histamine as a neurotransmitter in the stomatogastric nervous system of the spiny lobster. J. Neurosci. 4:708-721
- Colquhoun D and Rang H (1976) Effects of inhibitors on the binding of iodinated α -bungarotoxin to acetylcholine receptors in rat muscle. Molec. Pharmac. 12:519-535
- Colquhoun D, Dreyer F and Sheridan RE (1979) The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. J. Physiol. 293:247-284
- Coombe PE (1986) The large monopolar cells L1 and L2 are responsible for ERG transients in *Drosophila*. J. comp. Physiol. A 159:655-665
- Cousin JL and Motais R (1976) The role of carbonic anhydrase inhibitors on anion permeability into ox red blood cells. J. Physiol. 256:61-80
- Datum KH, Weiler R and Zettler F (1986) Immunocytochemical demonstration of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in R7 photoreceptors and C2 centrifugal fibres in the blowfly visual system. J. Comp. Physiol. A 159:241-249
- Datum KH (1987) Immunocytochemischer und elektrophysiologischer Nachweis von Transmittern im Komplexauge von *Calliphora erythrocephala*. Dissertation an der Universität München
- Datum KH, Rambold I and Zettler F (1989) Cholinergic neurons in the lamina ganglionaris of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. Cell Tissue Res. in press

- David JA and Satelle DB (1984) Actions of cholinergic pharmacological agents on the cell body membrane of the fast coxal depressor motoneurone of the cockroach (*Periplaneta americana*). J. exp. Biol. 108:119-136
- Deisz RA and Lux HD (1982) The role of intracellular chloride in hyperpolarizing postsynaptic inhibition. J. Physiol. 326:123-138
- DeVoe RD (1985) The Eye: Electrical activity. In: Kerkut GA and Gilbert I (eds) Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 6, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt pp.277-354
- Donnellan JF, Jewess PJ and Cattell KJ (1975) Subcellular localization and properties of a cholinergic receptor isolated from housefly heads. J. Neurochem. 25:623-629
- Dudai Y (1978) Properties of an α -bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor from *Drosophila melanogaster*. Biochim. Biophys. Acta 539:505-517
- Dudai Y (1980) Cholinergic receptors of *Drosophila*. In: Satelle DB, Hall LM and Hildebrand JG (eds) Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.93-110
- Earl J and Large WA (1974) Electrophysiological investigation of GABA-mediated inhibition at the hermit crab neuromuscular junction. J. Physiol. 236:113-127
- Eldefrawi AT and Eldefrawi ME (1987) Receptors for GABA and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. FASEB J. 1:262-271
- Elias MS and Evans PD (1983) Histamine in the insect nervous system: distribution, synthesis and metabolism. J. Neurochem. 41:562-568
- Evans MG, Marty A, Tan YP and Trautmann A (1986) Blockade of Ca-activated Cl conductance by furosemide in rat lacrimal glands. Eur. J. Physiol. 406:65-68
- Fröhlich A (1985) Freeze-fracture study of an invertebrate multiple-contact synapse: The fly photoreceptor tetrad. J. comp. Neurol. 241:311-326
- Gilbert RFT, Hanley MR and Iversen LL (1979) [3 H] Quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic receptors in rat brain: comparison of results from intact brain slices and homogenates. Br. J. Pharmacol. 65:451-456

- Green (1987) Histamine receptors. In: Meltzer HY (ed) Psychopharmacology: The third generation of progress, Raven press, New York, pp.273-279
- Greenspan RJ (1980) Mutations of Choline acetyltransferase and associated neural defects in *Drosophila melanogaster*. J. comp. Physiol. 137: 83-92
- Guy RG and Srinivasan MV (1988) Integrative properties of second-order visual neurons: a study of large monopolar cells in the dronefly *Eristalis*. J. comp. Physiol. A 162:317-331
- Hardie RC (1987) Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? J. Comp. Physiol. A 161:203-213
- Hardie RC (1988) Effects of antagonists on putative histamine receptors in the first visual neuropile of the housefly *Musca domestica*. J. Exp. Biol. 138:221-241
- Hill DR and Bowery NG (1981) ^3H -baclofen and ^3H -GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. Nature 290:149-152
- Järvilehto M and Zettler F (1971) Localized intracellular potentials from pre- and postsynaptic components in the external plexiform layer of an insect retina. Z. vergl. Physiol. 75:422-440
- Johnston GAR (1978) Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18:269-289
- Kelly JS (1975) Microiontophoretic application of drugs onto single neurons. In: Iversen et al (eds) Handbook of Psychopharmacology Vol 2 New York pp.29-67
- Kirschfeld K (1967) Die Projektion der optischen Umwelt auf das Raster der Rhabdomere im Komplexauge von *Musca*. Exp. Brain Res. 3:248-270
- Klingman A and Chappell RL (1978) Feedback synaptic interaction in the dragonfly ocellar retina. J. gen. Physiol. 71:157-175
- Krnjevic K, Mitchell JF and Szerb JC (1963) Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes. J. Physiol. 165:421-436
- Laughlin Sb (1973) Neural integration in the first optic neuropile of dragonflies. I. Signal amplification in dark-adapted second-order neurons. J. comp. Physiol. 84:335-355

- Laughlin SB (1974a) Neural integration in the first optic neuropile of dragonflies. III. The transfer of angular information. *J. comp. Physiol.* 92:377-396
- Laughlin SB (1974b) Resistance changes associated with the response of insect monopolar neurons. *Z. Naturforsch.* 29c:449-450
- Laughlin SB (1981) Neural principles in the peripheral visual systems of invertebrates. In: Autrum H (ed) (Handbook of sensory physiology Vol VII/6 B) Springer, Berlin Heidelberg New York pp.133-280
- Laughlin SB (1984) The roles of parallel channels in early visual processing by the arthropod compound eye. In: Photoreception and vision in invertebrates Ali (ed) NATO ASI series A Vol 74 New York pp.457-481
- Lees G, Beadle DJ, Neumann R and Benson JA (1987) Responses to GABA by isolated insect neuronal somata: pharmacology and modulation by a benzodiazepine and a barbiturate. *Brain Res.* 401:267-278
- Llinás RR (1987) Neural transmission, squid giant synapse. In: Adelman G (ed) *Encyclopedia of Neuroscience* Vol II, Birkhäuser, Boston Basel Stuttgart, pp.760-763
- Lunt GG, Robinson TN, Miller T, Knowles WP and Olsen RW (1985) The identification of GABA receptor binding sites in insect ganglia. *Neurochem. Int.* 7:751-754
- Mansour NA, Eldefrawi ME and Eldefrawi AT (1977) Isolation of putative acetylcholine receptor proteins from housefly brain. *Biochem.* 16:4126-4132
- McLennan H (1970) Bicuculline and inhibition of crayfish stretch receptor neurones. *Nature* 228:674-675
- McLennan H (1973) Gamma-aminobutyric acid antagonists in crustacea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51:774-775
- Meyer EP, Matute C, Streit P and Nässel DR (1986) Insect optic lobe neurons identifiable with monoclonal antibodies to GABA. *Histochemistry* 84:207-216
- Nässel DR, Hagberg M and Seyan H (1983) A new possibly serotonergic neuron in the lamina of the blowfly optic lobe: an immunocytochemical Golgi EM study. *Brain Res.* 280:361-367
- Nässel DR, Holmqvist MH, Hardie RC, Håkanson R and Sundler F (1988) Histamin-like immunoreactivity in photoreceptors of the compound eyes and ocelli of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Musca domestica*. *Cell Tissue Res.* 253:639-646

- Neher E (1974) Elektronische Meßtechnik in der Physiologie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Nicol D and Meinertzhagen IA (1982) An analysis of the number and composition of the synaptic populations formed by photoreceptors of the fly. J. comp. Neurol. 207:29-44
- Nistri A and Constanti A (1979) Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. Prog. Neurobiol. 13:117-235
- Obata K, Takeda K and Shinozaki H (1970) Electrophoretic release of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid from micropipettes. Int. J. Neuropharmacol. 9:191-194
- Pirvola U, Tuomista L, Yamatodani A and Panula P (1988) Distribution of histamine in the cockroach brain and visual system: Immunocytochemical and biochemical study. J. comp. Neurol. 276:514-527
- Prives JM (1980) Nicotinic acetylcholine receptors. In: Schulster D and Levitzki A (eds) Cellular receptors for hormones and neurotransmitters. Wiley & Sons Ltd., Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp.45-61
- Russell JM (1984) Chloride in the squid giant axon. Curr. Top. Membr. Transp. 22: 177-193
- Saint Marie RL and Carlson SD (1983a) The fine structure of neuroglia in the lamina ganglionaris of the housefly *Musca domestica*. J. Neurocytol. 12:213-241
- Saint Marie RL and Carlson SD (1983b) Glial membrane specializations and the compartmentalization of the lamina ganglionaris of the housefly compound eye. J. Neurocytol. 12:243-275
- Satelle DB (1980) Acetylcholine receptors of insects. In: Berridge MJ, Treherne JE and Wigglesworth VB (eds) Advances in Insect Physiology 15 Academic Press, London New York Sydney San Francisco pp.215-315
- Satelle DB (1984) Pharmacology of neurotransmitter receptors and ion channels in the insect CNS. In: Borkovec AB and Kelly TJ (eds) Insect neurochemistry and physiology, Plenum press, New York, pp.51-76
- Satelle DB (1985) Acetylcholine Receptors. In: Kerkut GA and Gilbert I (eds) Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 11, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp.395-434

- Satelle DB (1988) Insect acetylcholine receptors - biochemical and physiological approaches. In: Ford MG, Lunt GG, Reay RC and Usherwood PNR Neuropharmacology and pesticide action
- Schlemermeyer E, Schütte M and Ammermüller J (1989) Immunohistochemical and electrophysiological evidence that locust ocellar photoreceptors contain and release histamine. Neurosci. Let. in press
- Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M and Korner M (1986) Properties and roles of the three subclasses of histamine receptors in brain. J. exp. Biol. 124:203-224
- Shaw SR (1968) Organization of the locust retina. Symp. zool. Soc. Lond. 23:135-163
- Shaw SR (1977) Restricted diffusion and extracellular space in the insect retina. J. comp. Physiol. 113:257-282
- Shaw SR (1981) Anatomy and physiology of identified non-spiking cells in the photoreceptor-lamina complex of the compound eye of insects, especially Diptera. In: Roberts A and Bush BMH (eds) Neurons without impulses, cambridge university press, cambridge pp.61-116
- Shaw SR (1984) Early visual processing in insects. J. exp. Biol. 112:225-251
- Shimahara T, Pichon Y, Lees G, Beadle CA and Beadle J (1987) Gamma-butyric acid receptors on cultured cockroach brain neurones. J. Exp. Biol. 131:231-244
- Simmonds MA (1983) Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. TINS 6:279-281
- Simmons PJ (1982) The operation of connexions between photoreceptors and large second-order neurones in dragonfly ocelli. J. comp. Physiol. 149:389-398
- Simmons PJ and Hardie R (1988) Evidence that histamine is a neurotransmitter of photoreceptors in the locust ocellus. J exp. Biol. 138:205-219
- Stone SL and Chappell RL (1981) Synaptic feedback onto photoreceptors in the ocellar retina. Brain Res. 221:374-381
- Stone TW (1985) Microiontophoresis and pressure ejection. John Wiley & sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore

- Strange PG, Birdsall NJM and Burgen ASV (1978) Ligandbinding properties of muscarinic acetylcholine receptors in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. J.* 172:495-501
- Straka H and Zettler F (1988) Effects of transmitter antagonists on monopolar postsynaptic potentials. *Naturwissenschaften* 75:521-523
- Strausfeld NJ and Braitenberg V (1970) The compound eye of the fly (*Musca domestica*): connections between the cartridges of the lamina ganglionaris. *Z. Vergl. Physiol.* 70:95-104
- Strausfeld NJ (1971) The organization of the insect visual system (Light microscopy). *Z. Zellforsch.* 121: 377-441
- Strausfeld NJ and Campos-Ortega JA (1973) The L4 monopolar neurone: a substrate for lateral interaction in the visual system of the fly *Musca domestica* (L.). *Brain Res.* 59:97-117
- Strausfeld NJ and Campos-Ortega JA (1977) Vision in insects: pathways possibly underlying neural adaptation and lateral inhibition. *Science* 195:894-897
- Strausfeld NJ and Nässel DR (1981) Neuroarchitecture of brain regions that subserve the compound eyes of Crustacea and Insects. In: Autrum H (ed) *Vision in Invertebrates (Handbook of sensory physiology vol VII/6 B)* Springer, Berlin Heidelberg New York pp.1-122
- Strausfeld NJ (1984) Functional neuroanatomy of the blowfly's visual system. In: Photoreception and vision in invertebrates Ali (ed) *Nato ASI series A vol 74* New York pp.483-522
- Teichberg VI (1980) Amino acid receptors. In: Schulster D and Levitzki A (eds) *Cellular receptors for hormones and neurotransmitters.* Wiley & Sons Ltd., Chichester New York Brisbane Toronto pp.369-395
- Timpe LC and Stuart AE (1984) Is gamma-aminobutyric acid the neurotransmitter of barnacle photoreceptors? *Brain Res.* 307: 225-232
- Trujillo-Cenóz O and Melamed J (1970) Light and electron-microscope study of one of the systems of centrifugal fibres found in the lamina of muscoid flies. *Z. Zellforsch.* 110:336-349
- van Hateren JH (1987) Neural superposition and oscillations in the eye of the blowfly. *J. comp. Physiol. A* 161:849-855

- Wang GK Molinaro S and Schmidt J (1978) Ligand responses of α -bungarotoxin binding sites from skeletal muscle and optic lobe of the chick. J. Biol. Chem. 253:8507-8512
- Wilson M (1978) Generation of graded potential signals in the second order cells of locust oculus. J. comp. Physiol 124:317-331
- Yamamura HI and Snyder SH (1974) Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with [3 H] quinuclidinyl benzilate. Mol Pharmac. 10:861-867
- Zettler F (1969) Die Abhängigkeit des Übertragungsverhaltens von Frequenz und Adaptationszustand; gemessen am einzelnen Lichtrezeptor von *Calliphora erythrocephala*. Z.vergl. Physiol. 64:432-449
- Zettler F and Järvilehto M (1971) Decrement-free conduction of graded potentials along the axon of a monopolar neuron. Z. vergl. Physiol. 75:402-421
- Zettler F and Järvilehto M (1972) Lateral inhibition in an insect eye. Z. vergl. Physiol. 76:233-244
- Zettler F and Järvilehto M (1973) Active and passive propagation of non-spike signals in the retina of *Calliphora*. J.comp. Physiol. 85:89-104
- Zettler F and Autrum H (1975) Chromatic properties of lateral inhibition in the eye of a fly. J. comp. Physiol. 97:181-188
- Zettler F and Weiler R (1976) Neuronal processing in the first optic neuropile of the compound eye of the fly. In: Zettler F and Weiler R (eds) Neural principles in vision Springer Verlag, Heidelberg New York pp.227-237
- Zettler F and Straka H (1987) Synaptic chloride channels generating hyperpolarizing on-responses in monopolar neurons of the blowfly visual system. J. Exp. Biol. 131:435-438
- Zimmermann RP (1978) Field analysis and the physiology of second-order neurons in the visual system of the fly. J. Comp. Physiol. 126:297-316

LEBENS LAUF

Hans Straka

Geboren am 20.3.1961 in Dirlewang/Unterallgäu als Sohn des Schlossers Hans Straka und seiner Frau Maria

Herbst 1967 Eintritt in die Volksschule Oberammergau

Herbst 1971 Übertritt in das Werdenfelsgymnasium in Garmisch-Partenkirchen

Juni 1980 Abitur am Werdenfelsgymnasium in Garmisch-Partenkirchen

ab Juli 1980 Ableisten des 15 monatigen Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr

November 1981 Aufnahme des Studiums der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dezember 1985 Bestehen der mündlichen Diplombiologen-Hauptprüfung

Oktober 1986 Diplom in Biologie mit der Diplomarbeit: "Untersuchungen über die ionalen Mechanismen der lichtinduzierten Antwort von monopolaren Zellen bei *Calliphora erythrocephala*."

November 1986 Wissenschaftliche Hilfskraft in Forschung und Lehre am Zoologischen Institut der Universität München

ab April 1987 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. F.Zettler an einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt

